

**FLÜCHTIGE STOFFE AUS
CICER ARIETINUM -SAMEN**

**Identifizierung
und Einfluß auf das Verhalten von
Heliothis armigera -Larven**

Peter Wallner

Disbui. München
1988



FLÜCHTIGE STOFFE AUS
CICER ARIETINUM - SAMEN

Identifizierung
und Einfluß auf das Verhalten von
Heliothis armigera - Larven

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Zur Beurteilung eingereicht
am 7. Dezember 1987

von
Peter Wallner
aus München

1. Gutachter : Prof. Dr. H. Rembold
2. Gutachter : Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung : 10. Februar 1988

1	Einleitung	1
2	Die Kunst des Denkens	2
3	Die Kunst des Handelns	3
4	Die Kunst des Lebens	4
5	Die Kunst der Wissenschaft	5
6	Die Kunst der Politik	6
7	Die Kunst der Religion	7
8	Die Kunst der Philosophie	8
9	Die Kunst der Poesie	9
10	Die Kunst der Malerei	10
11	Die Kunst der Musik	11
12	Die Kunst der Architektur	12
13	Die Kunst der Gartenkunst	13
14	Die Kunst der Landwirtschaft	14
15	Die Kunst der Handarbeit	15
16	Die Kunst der Medizin	16
17	Die Kunst der Jurisprudenz	17
18	Die Kunst der Theologie	18
19	Die Kunst der Historie	19
20	Die Kunst der Geographie	20
21	Die Kunst der Chronologie	21
22	Die Kunst der Kosmologie	22
23	Die Kunst der Meteorologie	23
24	Die Kunst der Astronomie	24
25	Die Kunst der Mathematik	25
26	Die Kunst der Physik	26
27	Die Kunst der Chemie	27
28	Die Kunst der Biologie	28
29	Die Kunst der Zoologie	29
30	Die Kunst der Botanik	30
31	Die Kunst der Mineralogie	31
32	Die Kunst der Geologie	32
33	Die Kunst der Archäologie	33
34	Die Kunst der Epigraphik	34
35	Die Kunst der Numismatik	35
36	Die Kunst der Paläontologie	36
37	Die Kunst der Ethnologie	37
38	Die Kunst der Linguistik	38
39	Die Kunst der Literaturwissenschaft	39
40	Die Kunst der Kunstwissenschaft	40
41	Die Kunst der Religionswissenschaft	41
42	Die Kunst der Philosophiegeschichte	42
43	Die Kunst der Wissenschaftsgeschichte	43
44	Die Kunst der Kulturgeschichte	44
45	Die Kunst der Sozialgeschichte	45
46	Die Kunst der Wirtschaftsgeschichte	46
47	Die Kunst der Politikgeschichte	47
48	Die Kunst der Kirchengeschichte	48
49	Die Kunst der Weltgeschichte	49
50	Die Kunst der Universalien	50
51	Die Kunst der Metaphysik	51
52	Die Kunst der Logik	52
53	Die Kunst der Psychologie	53
54	Die Kunst der Anthropologie	54
55	Die Kunst der Ethik	55
56	Die Kunst der Politikwissenschaft	56
57	Die Kunst der Soziologie	57
58	Die Kunst der Ökonomie	58
59	Die Kunst der Rechtswissenschaft	59
60	Die Kunst der Staatswissenschaft	60
61	Die Kunst der Verwaltungswissenschaft	61
62	Die Kunst der Militärwissenschaft	62
63	Die Kunst der Seemannschaft	63
64	Die Kunst der Schiffbauwissenschaft	64
65	Die Kunst der Luftfahrtwissenschaft	65
66	Die Kunst der Raumfahrtwissenschaft	66
67	Die Kunst der Weltraumwissenschaft	67
68	Die Kunst der Kosmologiegeschichte	68
69	Die Kunst der Astronomiegeschichte	69
70	Die Kunst der Mathematikgeschichte	70
71	Die Kunst der Physikgeschichte	71
72	Die Kunst der Chemiegeschichte	72
73	Die Kunst der Biologiegeschichte	73
74	Die Kunst der Zoologiegeschichte	74
75	Die Kunst der Botanikgeschichte	75
76	Die Kunst der Mineralogiegeschichte	76
77	Die Kunst der Geologiegeschichte	77
78	Die Kunst der Archäologiegeschichte	78
79	Die Kunst der Epigraphikgeschichte	79
80	Die Kunst der Numismatikgeschichte	80
81	Die Kunst der Paläontologiegeschichte	81
82	Die Kunst der Ethnologiegeschichte	82
83	Die Kunst der Linguistikgeschichte	83
84	Die Kunst der Literaturwissenschaftgeschichte	84
85	Die Kunst der Kunstwissenschaftgeschichte	85
86	Die Kunst der Religionswissenschaftgeschichte	86
87	Die Kunst der Philosophiegeschichte	87
88	Die Kunst der Wissenschaftsgeschichte	88
89	Die Kunst der Kulturgeschichte	89
90	Die Kunst der Sozialgeschichte	90
91	Die Kunst der Wirtschaftsgeschichte	91
92	Die Kunst der Politikgeschichte	92
93	Die Kunst der Kirchengeschichte	93
94	Die Kunst der Weltgeschichte	94
95	Die Kunst der Universalien	95
96	Die Kunst der Metaphysik	96
97	Die Kunst der Logik	97
98	Die Kunst der Psychologie	98
99	Die Kunst der Anthropologie	99
100	Die Kunst der Ethik	100



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554824_0061

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
II.	Ziele der Arbeit	9
III.	Material und Methoden	10
1.	Versuchstiere, Ausgangsmaterial	10
1.1	Laborzucht von <i>Heliothis armigera</i> (Hb.)	10
1.2	Versuchstiere	14
1.3	<i>Cicer arietinum</i> (L.)-Samen und -Samenmehle	14
1.4	Referenzsubstanzen	16
2.	Biologischer Test	17
2.1	Testraum, Testarena	17
2.2	Vorversuche zur Testanordnung	19
2.3	"Dreizack"-Anordnung	22
2.4	Auswertung der biologischen Tests	28
3.	Chemische Analytik	30
3.1	Vorversuche zur Probenahmetechnik	30
3.2	Headspace-Adsorption flüchtiger Verbindungen aus gemahlenen <i>Cicer arietinum</i> -Samen an Tenax	32
3.3	Headspace-Adsorption synthetischer Stoffe an Tenax	34
3.4	Gaschromatographie, thermische Desorption	36
3.5	Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)	40
3.6	Desorption flüchtiger Stoffe von Tenax unter den Bedingungen des Biotests	41
IV.	Ergebnisse	43
A.	Biologischer Teil	43
1.	Qualität und Auswahl der Versuchstiere	43
1.1	Einzelhaltung der Larven	43
1.2	Entwicklungszyklus von <i>H. armigera</i> in der Laborzucht	43
1.3	Gewichtszunahme im Larvenstadium; Hungertiere	45
2.	Vorversuche zur Testanordnung	48
2.1	Glastunneltest	48
2.2	Modifizierter Glastunneltest	50
2.3	Y - Anordnung	51
3.	Testergebnisse mit der "Dreizack"-Anordnung	53
3.1	Strömungsverhältnisse	53
3.2	Attraktivität des Kichererbsenmehls (KEM)	53
3.3	Attraktivität des an Tenax adsorbierten Gesamtaromas gemahlener Kichererbsen-Samen	56
3.4	Versuche mit nicht auf Kichererbsen geprägten Larven	58
3.5	Larventests mit synthetischen Stoffen	62

B.	Chemischer Teil	67
4.	Vorversuche zum Probenahmeverfahren	67
4.1	Soxhlet-Extraktion, HPLC-Fraktionierung	67
4.2	Perforation	67
4.3	Headspace-Adsorption, Flüssigdesorption	68
5.	Überprüfung der gewählten analytischen Methoden: Headspace-Adsorption an Tenax / thermische Desorption / Gaschromatographie	69
5.1	Funktionsfähigkeit des GC-Systems (Normalbetrieb)	69
5.2	Thermische Desorption (Leerdesorption)	72
5.3	Blindprobenahme	72
5.4	Probenahme flüchtiger Stoffe aus <i>Cicer arietinum</i> -Samen	74
5.5	Quantitative Adsorption	74
5.6	Quantitative Desorption	76
6.	Qualitative Analyse : Identifizierung flüchtiger Stoffe aus <i>Cicer arietinum</i> -Samen	77
6.1	Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)	77
6.2	Co-Chromatographie	83
6.3	Kovats - Indices	87
6.4	Unvollständige Identifizierungen	88
6.5	Mengenangaben, Aufteilung nach Substanzklassen	88
6.6	Nicht identifizierte Verbindungen	90
7.	Quantitative Analyse	92
7.1	Reproduzierbarkeit der Headspace-Probenahme von <i>Cicer arietinum</i> -Samen	92
7.2	Bestimmung der Absolutmengen an 2 Beispielen	94
8.	Quantitative Analysen zum biologischen Test	96
8.1	Desorption des <i>Cicer arietinum</i> -Gesamtaromas von Tenax unter Biotest-Bedingungen	96
8.2	Reproduzierbarkeit der Headspace-Probenahme von synthetischen Stoffen	101
8.3	Desorption von Reinstoffen unter Testbedingungen	102
9.	Untersuchung indischer <i>Cicer arietinum</i> -Varietäten	103

V.	Diskussion	107
1.	Biologischer Test	107
1.1	Testaufbau	107
1.2	Testtiere	109
2.	Attraktivität des Gesamtaromas gemahlener <i>C. arietinum</i> -Samen für <i>H. armigera</i> -Larven	110
3.	Analytische Methodik	112
3.1	Headspace - Untersuchung	112
3.2	Anreicherung flüchtiger Verbindungen aus dem Headspace	113
3.3	Adsorption an porösen Polymeren	114
3.4	Auswahl des Adsorbens und der Desorptionsmethode	115
3.5	Gaschromatographie	117
3.6	Überprüfung der analytischen Methode	118
4.	Qualitative und quantitative Analyse des Gesamtaromas gemahlener <i>Cicer arietinum</i> -Samen	119
4.1	Vorgehen bei der qualitativen Analyse	119
4.2	Ergebnisse der qualitativen Analyse	120
4.3	Quantitative Analyse	123
5.	Kombination GC-Analytik / Biologischer Test	123
6.	Ergebnisse der biologischen Tests mit synthetischen Stoffen	124
7.	"Entstehung" der Kairomone	126
8.	Mögliche Anwendungen des Kairomons	127
VI.	Zusammenfassung	128
VII.	Literaturverzeichnis	130

Abkürzungen

ICRISAT	International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru, bei Hyderabad, Andhra Pradesh, Indien
L ₁ , L ₂ ...	<i>Heliothis armigera</i> -Larven des 1., 2... Stadiums
♀♀	Adulte, weibliche <i>Heliothis armigera</i>
♂♂	Adulte, männliche <i>Heliothis armigera</i>
[Σ]	Insgesamt getestete Tiere
[+]	Testtiere, die zur Substanzseite liefen
[-]	Testtiere, die zur Kontrollseite liefen
[Ø]	Inaktive Testtiere
KEM	Kichererbsenmehl (III.1.3.3)
KEMV	KEM, vakuumbehandelt (III.1.3.4)
KEMVW	KEMV mit eingestelltem Wassergehalt (III.1.3.4)
LEER	Leeres Probenröhrchen
T[LEER]	Unbeladenes, ausgeheiztes Tenaxröhrchen
T[KEM]	Tenaxröhrchen, beladen mit KEM-Gesamtaroma
T[Z]	Tenaxröhrchen, beladen mit der Substanz Z
PW	Präferenzwert (III.2.4.1)
n.s.	nicht signifikant im χ^2 -Test
*	signifikant im χ^2 -Test (P < 0.05)
**	signifikant im χ^2 -Test (P < 0.01)
***	signifikant im χ^2 -Test (P < 0.001)
UV	Ultraviolett Licht
VIS	Sichtbares Licht
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
GC	Gaschromatographie
MS	Massenspektrometrie
GC/MS	Gekoppelte Gaschromatographie/Massenspektrometrie
M+	Molekülion

I. Einleitung

Der Eiweißmangel ist ein besonders problematischer Aspekt der Unterernährung in zahlreichen Ländern der Dritten Welt. Da tierisches Protein oft nicht in ausreichendem Maß zur Verfügung steht, muß der Schwerpunkt auf die Produktion von hochwertigem pflanzlichem Eiweiß gelegt werden. Hier bieten sich die Leguminosen mit ihren eiweißreichen Samen an, insbesondere zur Ergänzung einer meist auf Getreideerzeugnissen basierenden Ernährung.

Unter den für die menschliche Ernährung genutzten Leguminosen steht die Kichererbse (*Cicer arietinum* L., Fabaceae), gemessen an der Produktion, nach der Sojabohne, Erdnuß, Bohne und Erbse weltweit an 5. Position (Belitz und Grosch [1]). In den tropischen und subtropischen Regionen nimmt sie eine noch bedeutendere Stellung ein; die Hauptanbauggebiete der Kichererbse erstrecken sich auf den indischen Subkontinent, Äthiopien, Iran, Mexiko und das Mittelmeergebiet (Spanien, Italien, Türkei, Marokko), wobei auf Indien und Pakistan zusammen 85-90% der Weltproduktion entfallen (van der Maesen [2]).

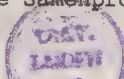
Die bis zu 45 cm hohe, buschige Pflanze trägt violette oder weiße Schmetterlingsblüten, die sich zu kurzen Hülsen mit 1-3 Samen entwickeln (Franke [3], vgl. Abb. 1). An Hand der Samen unterscheidet man zwei Typen von Kichererbsen: "Kabuli", relativ große Samen mit glatter, beigefarbener Schale und "Desi", kleinere Samen mit rauher, dunkelbrauner Oberfläche (Singh [4]).

Tabelle 1 gibt Auskunft über die Art und Verteilung der Sameninhaltsstoffe; der weitaus überwiegende Anteil an Kohlenhydraten, Eiweiß und Fett entfällt dabei auf die Speicherkeimblätter.

Tab.1 : Inhaltsstoffe von *Cicer arietinum*-Samen (%-Anteil an der Trockenmasse) und deren Verteilung; nach Chavan et.al. [5]

Inhaltsstoff	Anteil im gesamten Samen	Verteilung auf:		
		Schale	Kotyledonen	Embryo
Eiweiß	21.5 %	2.0 %	95.5 %	2.5 %
Kohlenhydrate	61.7 %	11.0 %	88.0 %	1.0 %
Fett	5.0 %	0.6 %	94.0 %	5.0 %
Rohfaser	8.0 %	87.0 %	13.0 %	0.0 %
Mineralstoffe	3.6 %	15.0 %	81.0 %	3.0 %

Der Eiweißgehalt der Samen hängt stark von den Umweltbedingungen (Boden, Bewässerung etc.) und der angebauten Varietät ab und schwankt von 12.4% bis 30.6% (Chavan et.al. [5], Singh et.al. [6]). Die Samenproteine, bei deren Auf-





trennung man neben Globulinen (57%) auch Gluteline (18%), Albumine (13%) u.a. erhält (Singh und Jambunathan [7]), sind biologisch relativ hochwertig; als limitierende Aminosäuren werden Methionin und Cystein angesehen (Singh [4]), während Lysin, die limitierende Aminosäure in vielen Getreideproteinen, in reichlicher Menge enthalten ist.

Beim Anbau der Kichererbsen in Indien ergeben sich vor allem zwei Probleme: durch Pilze verursachte Krankheiten und der Befall mit Schadinsekten. Von den Pilzkrankheiten sind zwei auf Grund ihrer wirtschaftlichen Bedeutung erwähnenswert: ein mit einer *Fusarium*-Infektion einhergehendes Welken der Pflanze (*Fusarium wilt*) und eine durch *Ascochyta rabiei* ausgelöste Krankheit (*Ascochyta blight*), die in Pakistan wiederholt Ernteverluste von rund 50% verursachte (van der Maesen [2], Singh et.al. [8]). Ein interessanter Aspekt dieser Krankheit ist, daß eine Infektion mit *Ascochyta rabiei* in der Kichererbsenpflanze die Bildung von Phytoalexinen (Medicarpin, Maackiain) induziert (Weigand et.al. [9], Kessmann und Barz [10]).

Während die meisten Leguminosen von einer Vielzahl phytophager Insekten befallen werden, tritt bei der Kichererbse im wesentlichen nur ein Schadinsekt, *Heliothis armigera* (s.u.) auf, das allerdings erhebliche Ernteauffälle verursacht. Der relativ gute Schutz von *Cicer arietinum* gegen Insektenbefall wird auf das Exsudat zurückgeführt, das alle grünen Teile der Pflanze in feinen Tröpfchen bedeckt (s. Abb. 1) (Rembold [11], Lateef [12], Koundal und Sinha [13]). Dieses Exsudat weist einen pH-Wert von etwa 1.2 und einen Gehalt an freier Äpfelsäure von 70-100% des Trockengewichts auf (Rembold und Winter [14]). Da *Heliothis armigera* jedoch immense Schäden im Kichererbsenanbau verursacht, ist dieses Insekt offensichtlich in der Lage, das stark saure Exsudat zu tolerieren, wenn es auch bevorzugt *Cicer arietinum*-Varietäten mit relativ niedrigen Malatkonzentrationen im Exsudat befällt (Rembold [11]).

Heliothis armigera (Hübner) (Lepidoptera; Noctuidae), ein nachtaktiver Schmetterling, ist in den tropischen, subtropischen und gemäßigt warmen Regionen Asiens, Afrikas, Europas und Australiens weit verbreitet (Hill [15]). Der Entwicklungszyklus des holometabolen Insekts verläuft vom Ei über das Larvenstadium mit normalerweise 5 Häutungen und die Puppenphase in der Erde bis zum adulten Tier. Da jedes ♀ durchschnittlich mehr als 1000 Eier legt, kommt es unter geeigneten Bedingungen zu einer raschen Vermehrung. Die eigentlichen landwirtschaftlichen Schädlinge sind die Larven, die z.B. bei Kichererbsen Hülsen, Samen, Blüten, Blütenknospen und Blätter fressen (vgl. Abb.1) und sich durch eine ungewöhnlich hohe Mobilität auszeichnen: die Raupen wandern sowohl auf einer Pflanze von Blüte zu Blüte oder von Frucht zu Frucht, als auch zwischen verschiedenen Wirtspflanzen und

Abb. 1 (S.2) : *Heliothis armigera*-Larven auf einer Kichererbsenpflanze (oben), durch *H. armigera*-Larven beschädigte Kichererbsen-Hülsen (unten)

konsumieren dabei die befallenen Pflanzenteile oft nur unvollständig (Zalucki et.al. [16], Lateef [17]). Dieses Verhalten führt selbst bei relativ geringen Larvenpopulationen zu enormen Schäden. (Zur Biologie von *Heliothis armigera* vgl. die Übersichtsartikel von Hardwick [18] und Jayaraj [19]).

Heliothis armigera ist ein extrem polyphages Insekt, für das allein in Indien 181 Pflanzenarten aus 45 Familien als Wirtspflanzen verzeichnet wurden (Manjunath et.al. [20]), darunter so bedeutende Nutzpflanzen wie Baumwolle, Tabak, Mais, Hirse, Erdnuß und Sojabohne. Das drückt sich auch in den zahlreichen, für *Heliothis armigera* gebräuchlichen Trivialnamen aus: corn earworm, tobacco budworm, cotton bollworm, tomato fruitworm, gram pod borer etc.. Auf Grund der weiträumigen geographischen Verteilung und der polyphagen Natur zählt *Heliothis armigera* zu den weltweit wichtigsten Schadinsekten; so werden die Verluste durch *Heliothis armigera* allein im Kicher- und Straucherbsenanbau Indiens auf über 300 Millionen Dollar pro Jahr geschätzt (Reed und Pawar [21]).

Die Bekämpfung von *Heliothis* in der Landwirtschaft erfolgte bisher nahezu ausschließlich mit Hilfe von Insektiziden, jedoch wird diese Strategie in jüngerer Zeit mehr und mehr in Frage gestellt. So entwickelte *Heliothis armigera* in Australien Resistenzen gegen DDT, Endosulfan und synthetische Pyrethroide (Zalucki et.al. [16], Gunning et.al. [22]); *Heliothis virescens*, resistent gegen alle herkömmlichen Insektizide, wurde erst durch den massiven Einsatz von Pestiziden von 1930 bis 1950 und der damit verbundenen Ausrottung der natürlichen Feinde zum größten Baumwollschädling Nordamerikas, während dieses Insekt vorher im Baumwollanbau keine Rolle gespielt hatte (Reed und Pawar [21]).

Derartige Ereignisse, zusammen mit einem wachsenden Bewußtsein für die durch den Einsatz von Insektiziden verursachten Umweltprobleme - Persistenz schwer abbaubarer Pestizide und deren Anreicherung über die Nahrungskette, unspezifische Wirkung der Breitband-Insektizide - führten zu einer verstärkten Suche nach selektiveren und biologisch abbaubaren Pestiziden und lenkten die Aufmerksamkeit auf die Erforschung alternativer Methoden zur Schädlingsbekämpfung (Pheromonfallen, natürliche Feinde, massenweise Freisetzung sterilisierter Insekten, Züchtung resistenter Pflanzensorten etc.).

So listeten Pawar et.al. [23] die in Indien bekannten natürlichen Feinde von *Heliothis armigera* auf und fanden dabei neben mikrobiellen Krankheitserregern 28 Parasiten (4 im Ei-, 24 im Larvenstadium) sowie 21 bzw. 5 räuberische Insekten- bzw. Spinnenarten. Konkrete Versuchsprogramme zur biologischen Kontrolle von *Heliothis armigera* umfaßten die Erprobung parasitärer Insekten (*Cotesia kazak*, Hymenoptera; *Eucelatoria bryani*, Diptera) (Cameron und Valentine [24], Mani et.al. [25]) und Nematoden (*Neoaplectana carpocapsae*) (Bong [26]), sowie pathogener Bakterien (*Bacillus thuringiensis*) (Hafez et.al. [27], Kristiansen und Lewis [28]) und

Viren (Kernpolyeder-Viren, NPV) (Salama et.al. [29], Vogel [30]).

Eine andere Möglichkeit besteht darin, die von Insekten benutzten chemischen Signalstoffe zu ihrer Bekämpfung einzusetzen. Abb.2 gibt eine Übersicht über die Terminologie dieser Stoffe.

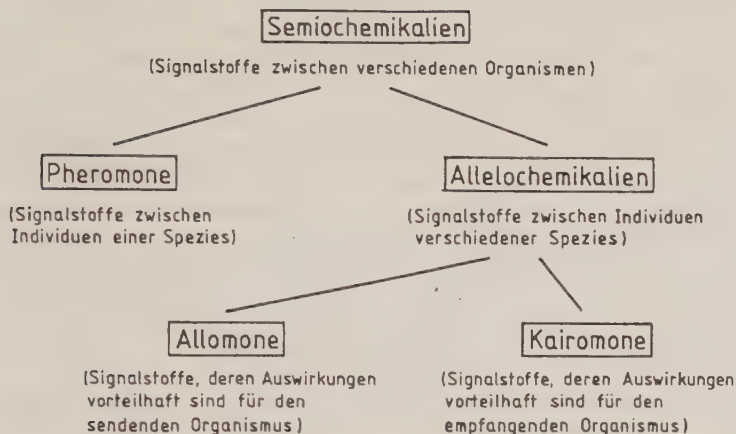


Abb.2 : Terminologie chemischer Signalstoffe zwischen Organismen (vereinfacht nach Nordlund [31])

Am bekanntesten sind in diesem Zusammenhang die Sexual"pheromone" (von griech. *pherein* = tragen, *horman* = er-, anregen; Karlson und Butenandt [32]), die von den ♀♀ emittiert werden, um die ♂♂ zur Paarung anzulocken. Bei *Heliothis armigera* besteht dieses Sexualpheromon aus einem Gemisch aus cis-11- und cis-9-Hexadecenal sowie cis-11-Hexadecen-1-ol (Nesbitt et.al. [33]).

Sexualpheromone werden auf verschiedene Weise zur Insektenbekämpfung eingesetzt (Campion [34]) :

- "mating disruption": das zu behandelnde Areal wird über einen längeren Zeitraum hinweg mit einer konstant hohen Konzentration des synthetischen Pheromons "überflutet", um dadurch das Auffinden der ♀♀ durch die ♂♂ und damit die Paarung zu unterbinden.
- "mass trapping": ein dichtes Netz von Pheromonfallen wird installiert, um den Großteil der ♂♂ zu fangen und so die Zahl der Insekten zu reduzieren.

- "monitoring": Pheromonfallen dienen der Überwachung des Populationsniveaus einer bestimmten Insektenart, um den Einsatz von Insektiziden auf das wirklich notwendige Maß zu beschränken.

Wie bei vielen anderen Insektenarten hat sich auch bei *Heliothis armigera* nur die letzte der drei genannten Methoden als praktikabel erwiesen.

Neuere Ansätze versuchen, die außerordentlich komplexen Wechselwirkungen zwischen Wirtspflanze und Insekt zu erforschen, um auch pflanzliche Allelochemikalien in das Konzept des integrierten Pflanzenschutzes einzubinden.

Jede potentielle Wirtspflanze wird durch eine Vielzahl von Merkmalen charakterisiert, wie etwa Form, Farbe, Oberflächenstruktur, Wassergehalt und Hunderte von chemischen Verbindungen. Dem steht ein ebenso kompliziertes Wahrnehmungssystem beim Insekt gegenüber (Geruchs- und Geschmacksrezeptoren, Tastsinn, Sehen). Eine "Erkennung" oder "Annahme" einer potentiellen Wirtspflanze durch das Insekt erfolgt dann, wenn das Muster der von der Pflanze ausgehenden Stimuli zu einem vorgegebenen Suchprofil des Insekts paßt (Dethier [35]). Dabei kann dieses Suchprofil variieren, d.h. gegebene äußere Reize können je nach dem physiologischen Zustand des Insekts (z.B. Hunger oder Sättigung) verschiedene Entscheidungen auslösen (Reese et.al. [36]).

Miller und Strickler [37] haben versucht, diese komplizierten Wechselbeziehungen in einem Schema zusammenzufassen (Abb.3).

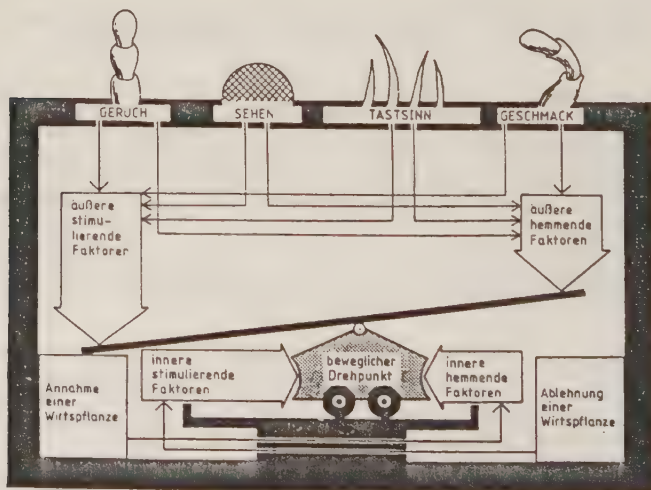


Abb. 3: Einflüsse äußerer und innerer Faktoren auf das Verhalten eines Insekts gegenüber einer potentiellen Wirtspflanze. Nach Miller und Strickler [37].

Schoonhoven [38] postuliert als heute gültige Modellvorstellung :

- (1) Alle Pflanzen besitzen Allomone zum Schutz gegen Insekten (u.a.)
- (2) Einige Insektenarten können die Allomone bestimmter Pflanzenarten tolerieren
- (3) Einige Insektenarten benützen diese Substanzen als Kaiomone zur Erkennung ihrer Wirtspflanzen

Die bisherige Forschung hat sich jedoch fast ausschließlich auf die Allomone beschränkt. So wurden z.B. verschiedene Pflanzenextrakte auf eine fraßabschreckende Wirkung für *Heliothis*-Larven bzw. auf eine die Eiablage der *Heliothis*-♀♀ reduzierende Wirkung untersucht (Hongo und Karel [39], Tingle und Mitchell [40]).

Dagegen gibt es nur wenige Arbeiten über Kaiomone als Schlüsselsubstanzen für die Erkennung der Wirtspflanze durch das Insekt. Saxena [41,42] betont dabei die Bedeutung der ersten Phase dieses Erkennungsprozesses, der Orientierung des Insekts zur Wirtspflanze, sei es die Nahrung suchende Larve oder das zur Eiablage bereite ♀. In dieser Phase spielen Stimuli, die über einige Entfernung hinweg wirksam sind, die entscheidende Rolle, d.h. optische Reize und attraktive Geruchsstoffe (flüchtige Kaiomone). Erst nach einer positiven Entscheidung des Insekts in dieser ersten Phase können Kontakt-Stimuli wie Geschmack und Oberflächenstruktur wirksam werden.

Die Identifizierung derartiger flüchtiger Kaiomone könnte neben dem grundsätzlichen Interesse auch von praktischer Bedeutung sein : diese Stoffe könnten dazu dienen, begattete, zur Eiablage bereite ♀♀ bzw. nach Nahrung suchende Larven anzulocken und in Fallen zu fangen, ein Ansatz, der unter dem Aspekt der Schadensverhütung wesentlich effektiver erscheint als das Fangen der ♂♂ mit Hilfe von Sexualpheromonen (Rembold [43]).

Dennoch konnten bisher nur für relativ wenige Insektenarten solche Wirtspflanzenkaiomone identifiziert werden, so z.B. für *Anthonomus grandis* und *Spodoptera littoralis* aus Baumwolle (Minyard et.al. [44], Salama et.al. [45]), für *Leptinotarsa decemlineata* aus Kartoffel (Visser und Ave [46]) und für *Rhagoletis pomonella* aus Äpfeln (Fein et.al. [47]).

Die vorliegende Arbeit greift das Problem der Kaiomone am Modellsystem Kichererbse / *Heliothis armigera* auf. Ausgehend von ersten, vorläufigen Versuchen von Saxena und Rembold [48], die eine Attraktivität gemahlener *Cicer arietinum*-Samen für *Heliothis armigera*-Larven nahelegten, beschränkt sie sich dabei auf die Untersuchung flüchtiger Inhaltsstoffe von *Cicer arietinum*-Samen, die das Verhalten von *Heliothis armigera*-Larven beeinflussen.

Nach einer Literaturübersicht über flüchtige Lebensmittelinhaltsstoffe (van Straten und Maarse [49]) sind bisher keine Arbeiten über flüchtige Stoffe aus Kichererbsen-Samen bekannt; die Identifizierung dieser Verbindungen erscheint daher auch aus lebensmittelchemischer Sicht interessant.

II. Ziele der Arbeit

Für die vorliegende Arbeit ergaben sich somit folgende Zielsetzungen :

- (1) Die Entwicklung eines biologischen Tests, mit dessen Hilfe die Reaktion von *Heliothis armigera*-Larven auf flüchtige Verbindungen - sowohl komplexe Gemische als auch Reinstoffe, jeweils in beliebigen Konzentrationen - untersucht werden kann. Der Testaufbau sollte dabei insbesondere zum Nachweis attraktiv wirkender Verbindungen geeignet sein und die möglichen Einflüsse anderer Faktoren (Feuchtigkeit, optische Reize etc.) auf das Larvenverhalten ausschließen.
- (2) Die Erarbeitung eines Verfahrens zur Probenahme flüchtiger Pflanzeninhaltsstoffe in Form eines repräsentativen Aromas; d.h. die flüchtigen Verbindungen sollten so erfaßt werden, wie sie von dem untersuchten Pflanzenmaterial tatsächlich abgegeben werden und den Geruchseindruck bestimmen.
- (3) Die Erstellung einer analytischen Methode, die es erlaubt, komplexe Gemische flüchtiger Stoffe aufzutrennen und die Einzelkomponenten zu identifizieren. Um auch in äußerst geringen Mengen vorliegende Stoffe zu erfassen, sollte die Empfindlichkeit des gesamten Verfahrens einschließlich der Probenahme den Anforderungen der Spurenanalytik genügen.
- (4) Die möglichst umfassende qualitative und quantitative Analyse des Aromas von *Cicer arietinum*-Samen.
- (5) Die Untersuchung des Verhaltens von *Heliothis armigera*-Larven gegenüber dem Gesamtaroma von *Cicer arietinum*-Samen und gegenüber einzelnen darin enthaltenen Verbindungen; insbesondere sollte versucht werden, Komponenten mit attraktiver Wirkung (falls vorhanden) auf *Heliothis armigera*-Larven zu identifizieren.

Die zu erstellenden Methoden - (1) bis (3) - sollten allgemein, d.h. auf beliebige flüchtige Stoffe bzw. Pflanzen(teile) anwendbar sein, um anschließend mit ihrer Hilfe *Cicer arietinum*-Samen beispielhaft zu untersuchen : (4),(5).

III. Material und Methoden

1. Versuchstiere, Ausgangsmaterial

1.1 Laborzucht von *Heliothis armigera* (Hb.)

1.1.1 Herkunft

Als Ausgangsmaterial der Laborzucht von *Heliothis armigera* (Hübner) (*Lepidoptera*, *Noctuidae*) dienten Vorpuppen, die auf dem Gelände des International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT) bei Hyderabad, Indien, in Strauch- oder Kichererbsenfeldern gesammelt und zur Verpuppung in die dortigen Labors gebracht worden waren. Der Transport nach Deutschland erfolgte im Puppenstadium.

Wie von Waldbauer et. al. [50] und Roush [51] empfohlen, wurden während der Monate August bis April in Abständen von etwa vier Wochen zur Vermeidung von Inzucht-Phänomenen Adulte aus derartigen, im Feld gesammelten (Vor-)Puppen in die Laborzucht eingekreuzt (s.u.).

1.1.2 Zuchtbedingungen

Eier

Die von begatteten ♀♀ auf Papier abgelegten Eier wurden zur Oberflächendesinfektion mit wässriger Natriumhypochloritlösung (3 g aktives Chlor/l) behandelt (Leppla et.al. [52], Raulston und Lingren [53]), mit Leitungswasser gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet, in Plastikbecher überführt und bis zum Schlüpfen der Larven im Brutschrank aufbewahrt (28° C, 80% relative Luftfeuchtigkeit, Hell-/Dunkel-Rhythmus 16/8h).

Larven

Die Larven wurden in Kunststoffkästen auf einer halbkünstlichen Diät auf der Basis von Kichererbsen-Samen (*Cicer arietinum* L., *Fabaceae*) gehalten. Die Zusammensetzung dieser Diät (Tab. 2, I.) orientierte sich an den Arbeiten von Nagarkatti und Prakash [54], Dadd [55], Singh [56, 57], sowie Brewer und Lindig [58].

Tab. 2 : Zusammensetzung der verwendeten Larvendiäten
 I : Kichererbsen-Diät für die normale Zucht
 II: Luzerne-/Soja-Diät für einen speziellen Stamm

Komponente (Reinheit, Bezugsquelle)	Diät I	Diät II
Kichererbsen-Samen (<i>Cicer arietinum</i> L.), gemahlen; Scandimport, Maisach	200.0 g	
Gelbe Sojabohnen (<i>Glycine max</i> L.), gemahlen; Henselwerk, Magstadt		160.0 g
Luzerne (<i>Medicago sativa</i> L.), gemahlen; Bayerische Futtersaatanbau, Ismaning		50.0 g
Saccharose für biochemische und mikro- biologische Zwecke; Merck, Darmstadt	20.0 g	
Bierhefepulver Heliosan; Diasana, Radolfzell	20.0 g	40.0 g
Ascorbinsäure, Ph.Eur.I; Caesar & Loretz, Hilden	4.0 g	4.0 g
4-Hydroxybenzoesäuremethylester, für Lebensmittel; Merck, Darmstadt	2.5 g	4.0 g
Sorbinsäure, für Lebensmittel; Merck, Darmstadt	1.5 g	1.3 g
wäßrige Formaldehydlösung 10%ig, ver- dünnt aus Formaldehydlösung 35%, DAB 7; Merck, Darmstadt	5.0 ml	4.0 ml
Streptomycinsulfat, für biochemische Zwecke; Merck, Darmstadt	0.3 g	1.0 g
wäßrige Lösung von Cholinchlorid (20%ig); Sigma, St.Louis, USA	10.0 ml	
Cholesterin, USP; Sigma, St.Louis, USA	0.2 g	
Weizenkeimöl; Sigma, St.Louis, USA	1.8 g	
D,L- α -Tocopherolacetat, USP; Merck, Darmstadt	0.2 g	
Multivitaminpräparat Multibionta forte; Merck, Darmstadt *)	3 Kaps.	
Agar-Agar, Bacto-Agar; DIFCO-Laborato- ries, Detroit, Michigan, USA	15.0 g	16.0 g
Bidestilliertes Wasser	720.0 ml	800.0 ml
Summe :	ca. 1000.5 g	1080.3 g

Tab. 2, Fortsetzung:

- *) 1 Kapsel Multibionta forte enthielt :
 Vitamin A : 7500 I.E.; Vitamin-B₁-chloridhydrochlorid :
 10 mg; Vitamin-B₂ : 12.5 mg; Nicotinsäureamid : 60 mg;
 Dexpanthenol : 20 mg; Biotin : 150 µg; Vitamin-B₆-hydro-
 chlorid : 15 mg; Vitamin-B₁₂-Cyanokomplex : 10 µg; Vita-
 min C : 200 mg; Vitamin-E-acetat : 10 mg; Rutin : 30 mg.
-

Zur Bereitung der Diät wurden alle Komponenten (mit Ausnahme des Agars) in kaltem, bidestilliertem Wasser angerührt und mit einer siedenden Lösung des Agar-Agar in bidestilliertem Wasser versetzt. Die fertige, gut durchgerührte Mischung wurde noch heiß in den Boden der Larvenkästen aus Polystyrol (LICEFA, Bad Salzflun) (Abb. 4) ausgegossen; nach dem Einpressen der Deckelgitter in die halbfeste Diät ließ man völlig erkalten.

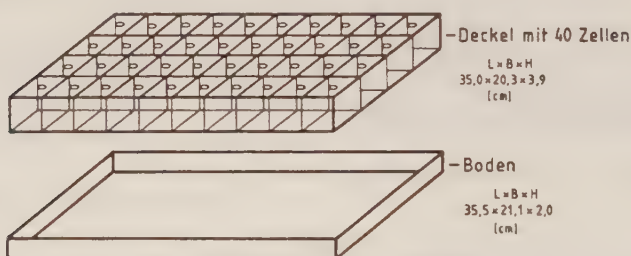


Abb. 4: Polystyrol-Kasten für die Aufzucht der *Heliothis armigera*-Larven

Jeder Larvenkasten enthielt ca. 500 g Diät und wurde vom Deckelgitter in 40 Zellen gleicher Größe (48x32x37 mm) unterteilt, in die die frisch geschlüpften Larven des 1. Stadiums (L₁) durch verschließbare Öffnungen in der Deckeloberseite eingesetzt werden konnten (1 L₁/Zelle, s.IV.1.1). Die Aufbewahrung der Kästen erfolgte für die Dauer der gesamten Larvenentwicklung, bis zur Verpuppung der Tiere, im Brutschrank unter den für die Eier angegebenen Bedingungen.

Puppen

Die Puppen wurden aus den Larvenkästen entnommen, in Plastischachteln überführt und bis zum Schlüpfen der Adulten im Brutschrank aufbewahrt (Bedingungen s.o.).

Adulte

Alle adulten Tiere erhielten eine 10%ige wässrige Honiglösung als Nahrung. Sie wurden bei leicht erhöhter Raumtemperatur (24-25° C) und 16/8h Hell-/Dunkel-Rhythmus gehalten.

Die Adulten wurden die ersten 2 Tage nach dem Schlüpfen nach Geschlecht getrennt aufbewahrt, zur Paarung am 3. Tag nach dem Schlüpfen in Paarungskäfige (s.u.) überführt (üblicherweise je 8 ♀♀ und ♂♂ pro Käfig) und dort 2-3 Tage belassen. Die begatteten ♀♀ hielt man anschließend zur Eiablage in mit Papier ausgelegten Plastikschränken.

Einkreuzungen

Um die Gefahr einer Kontamination der Laborzucht mit Viren, Bakterien, Parasiten etc. zu reduzieren, wurden die feldgesammelten Puppen aus Indien (s.o.) in einem gesonderten Quarantänaraum gehalten; dort erfolgten auch das Schlüpfen der Adulten, die Paarung mit Tieren aus der Laborzucht und die Eiablage. Die Eier wurden in der zur Behandlung verwendeten Natriumhypochloritlösung in den eigentlichen Zuchttraum gebracht.

1.1.3 "Luzerne/Soja-Stamm"

Für einige spezielle Experimente wurde getrennt von der obigen Zucht ein weiterer *Heliothis armigera* (Hb.) - Stamm gehalten. Als Grundlage für diesen dienten Puppen aus der Laborzucht des Volcani-Center, Agricultural Research Organization, Bet Dagan, Israel.

Diese Tiere waren dort auf einer Luzerne (*Medicago sativa* L., Fabaceae) / Soja (*Glycine max* L., Fabaceae) - Diät gezogen worden und nicht in Kontakt mit Kichererbsen gekommen. Diese Luzerne/Soja-Diät (Tab. 2, II) wurde auch bei uns beibehalten; ansonsten entsprachen die Zuchtbedingungen den oben beschriebenen.

1.1.4 Geräte, Chemikalien

- Larvenkästen : (s. Abb. 4), aus Polystyrol, LICEFA, Bad Salzufen.
- Paarungskäfige : 25x25x30 cm, Rückwand mit Drahtnetz, 3 Seitenscheiben aus Plexiglas, Boden aus Plastik, obere Abdeckplatte aus Glas.
- Brutschrank : Ehret, Emmendingen; Temperatur: 28° C, relative Luftfeuchtigkeit: ca. 80%, 16/8h Hell-/Dunkel-Rhythmus.
- Natriumhypochloritlösung : Originallösung: 150-155 g aktives Chlor/l; Rühl-Chemie, Karlsfeld b. München. Zur Behandlung von Larvenkästen u. a. Geräten: Verdünnung auf 15 g aktives Chlor/l. Zur Behandlung der Eier: Verdünnung auf 3 g aktives Chlor/l.
- Larvendiäten : s.o.
- Honiglösung : ca. 10%ige wässrige Lösung, kurz aufgekocht.

1.2 Versuchstiere

1.2.1 Larven des 1. Stadiums

Die auf Papierstreifen abgelegten, mit Natriumhypochloritlösung behandelten und getrockneten Eier wurden in Glasflaschen mit Schliffstopfen im Brutschrank (Bedingungen s.o.) aufbewahrt. Die L₁ schlüpfen in der dritten auf die Eiablage folgenden Nacht und wurden am darauffolgenden Tag im Alter von maximal 16 Stunden im Biotest eingesetzt.

Etwa 2 Stunden vor dem Test wurde auf die Glasflasche mit den L₁ über ein Verbindungsstück eine zweite, leere Glasflasche auf dem Kopf stehend aufgesetzt und die ganze Anordnung 1 Stunde lang unter einer Tageslichtlampe aufgestellt. Von den in dieser Zeitspanne in die obere Glasflasche gelaufenen L₁ überführte man etwa 1 Stunde vor dem Test die benötigte Anzahl Larven in Petrischalen mit angefeuchtetem Filterpapier und bewahrte diese bis zum Test in der Testarena (s.u.) auf.

1.2.2 Larven des letzten Stadiums

Larven des späten 4. Stadiums, kurz vor der L₄/L₅-Häutung (s.IV.1.2) wurden am Vorabend des Tests aus den Larvenkästen entnommen, einzeln ohne Nahrung in Petrischalen mit Filterpapier und feuchter Watte überführt und im Brutschrank (s.o.) aufbewahrt; über Nacht erfolgte dabei die Häutung zu L₅.

Etwa 1 Stunde vor dem Larventest brachte man die L₅ in die Testarena. Nach Beendigung des Biotests, spätestens 24 Stunden nach der Entfernung der Tiere von der Diät, wurden die L₅ wieder in die Larvenkästen zurückgesetzt. Dieses Vorgehen galt sowohl für Tiere aus der normalen Laborzucht, als auch für den "Luzerne/Soja-Stamm" (s.o.).

1.3 *Cicer arietinum* (L.) - Samen und - Samenmehle

1.3.1 Handelsübliche Standardsorte (Kabuli-Typ)

Die von der Fa. Scandimport, Maisach, bezogenen Kichererbsen-Samen (*Cicer arietinum* L., Fabaceae) gehörten zum Kabuli-Typ (relativ große, beigefarbene Samen mit glatter Oberfläch) und stammten aus Italien und der Türkei.

Ein Teil der Samen wurde gründlich mit warmem Leitungswasser gewaschen und 1 Woche lang bei Raumtemperatur getrocknet; andere Samen wurden dagegen ungewaschen verwendet (vgl.IV.5.4). Vor den Versuchen wurden alle Samen im Trockenschrank bei 40° C über Nacht getrocknet; der Wassergehalt betrug danach ca. 8% (Trocknungsmethode, s.I.3.5).

Von der Fa. Scandimport wurden mehrere Chargen dieser handelsüblichen Kichererbsen bezogen; für alle Versuche im

biologischen Test und zur qualitativen und quantitativen GC-Analyse flüchtiger Stoffe wurde stets die gleiche Charge (Standardsorte) benutzt; in einigen Vorversuchen (s. IV.5.5 und IV.8.1) und zur Bereitung der Larven-Diät fanden auch andere Chargen Verwendung.

1.3.2 Indische Varietäten (Desi-Typ)

Das ICRISAT in Hyderabad, Indien, stellte Samen dreier *Cicer arietinum*-Sorten aus den Ernten der Anbauzeiten 1983/84 und 1984/85 zur Verfügung: "Annigeri", "ICC-506" und "ICCX-730266". Alle 3 Varietäten gehörten zum Desi-Typ (kleine dunkelbraune Samen mit rauher Oberfläche) und benötigten in Indien etwa 100 Tage von der Aussaat bis zur Reife (schnell-reifende Sorten); alle Samen stammten aus insektizidfreiem Feldanbau.

1.3.3 Kichererbsenmehl für den Larventest (KEM)

Gewaschene und getrocknete *Cicer arietinum*-Samen der handelsüblichen Standardsorte wurden in einer IKA-M-20 Universalmühle (Janke & Kunkel, Staufen) in Portionen zu 25 g je 40 sec lang unter intensiver Wasserkühlung gemahlen. Das so erhaltene Kichererbsenmehl (KEM) wies einen Wassergehalt (s.u.) von ca. 8.2 % auf und diente, frisch nach dem Mahlen, als Geruchsquelle im modifizierten Glastunneltest (s. IV.2.2) und im Y-Olfaktometer (s. IV.2.3).

Für den Test in der Dreizack-Anordnung füllte man 3.0 g des frischen Kichererbsenmehls in die entsprechenden Probenröhrchen, verschloß diese luftdicht und setzte sie nach 2-stündigem Temperieren auf 28° C zum Test ein (vgl. IV.3.2).

1.3.4 Modifizierte Kichererbsenmehle für den Larventest (KEMV, KEMVW)

100 g des oben beschriebenen Kichererbsenmehls wurden in einem 2l - Kolben im Wasserbad auf 40° C temperiert und 5h lang unter häufigem Umschütteln des Kolbens an eine Hochvakuumanlage mit Quecksilberdiffusionspumpe angeschlossen. Der Druck in der Vakuumanlage betrug dabei 0.04 (anfangs) bis 0.005 Torr (am Ende). Das so erhaltene vakuumbehandelte Kichererbsenmehl (KEMV) wies einen Wassergehalt (s.u.) von 3.2 % auf und wurde als Kontrollsubstanz im Larventest verwendet (s. IV.3.2).

Ein Teil des vakuumbehandelten Kichererbsenmehls wurde in eine Kristallisierschale eingewogen und zur Wasseraufnahme in einem Exsikkator über bidestilliertem Wasser aufbewahrt, bis der Wassergehalt (s.u.) dem von frisch gemahlenem Kichererbsenmehl (8.2 %, s.o.) entsprach. Das so erhaltene vakuumbehandelte Kichererbsenmehl mit eingestelltem Wassergehalt (KEMVW) diente ebenfalls als Referenzsubstanz im Larventest (s. IV.3.2).

1.3.5 Bestimmung des Wassergehalts der Mehle

Die quantitative Bestimmung der bei 105° C flüchtigen Anteile (in erster Näherung mit dem Wassergehalt gleichzusetzen) erfolgte mit Hilfe der Trocknungsmethode.

Dazu wurden etwa 2 g des entsprechenden Mehls (KEM, KEMV bzw. KEMVW) genau in vorher getrocknete und gewogene Nickelschalen mit Seesand eingewogen, mit dem Seesand gründlich verrieben und im Trockenschrank bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (Doppelbestimmungen). Die Schalen wurden nach der Entnahme aus dem Trockenschrank bis zur Wägung zur Abkühlung in einem Exsikkator aufbewahrt.

1.4 Referenzsubstanzen

1.4.1 Co-Chromatographie, Biotest

Alle Referenzsubstanzen für die Co-Chromatographie und den biologischen Test stammten aus der Sammlung des Instituts für Lebensmitteltechnologie und Analytische Chemie der Technischen Universität München in Freising-Weihenstephan. Diese Vergleichssubstanzen waren von verschiedenen Herstellern bezogen worden; die Reinheit aller Verbindungen wurde durch Headspace-Adsorption (s.3.3) und anschließende GC-Analyse überprüft. Einige dieser Daten sind für die 16 im biologischen Test untersuchten Komponenten (vgl. IV.3.5) in Tab. 3 zusammengefaßt.

Die Referenzsubstanzen wurden bei -18° C im Dunkeln aufbewahrt.

Tab. 3 : Bezugsquellen und Reinheit der 16 im biologischen Test eingesetzten Reinstoffe

Verbindung	Bezugsquelle	Reinheit (GC) *)
Butan-1-ol	Fluka, Neu-Ulm	97.4 %
Pentan-1-ol	Merck, Darmstadt	99.6 %
Hexan-1-ol	Fluka, Neu-Ulm	99.8 %
(+)-Δ-3-Caren	Fluka, Neu-Ulm	98.4 %
D,L-Camphen	EGA, Steinheim	94.0 %
p-Cymol	Fluka, Neu-Ulm	94.9 %
(+)-Limonen	Fluka, Neu-Ulm	85.2 %
Myrcen	Roth, Karlsruhe	84.1 %
D,L-α-Pinen	Roth, Karlsruhe	99.0 %
D,L-β-Pinen	Aromachemie, Aufseß	97.8 %
γ-Terpinen	Roth, Karlsruhe	78.0 % **)
n-Octan	Merck, Darmstadt	98.5 %
2-trans-Heptenal	Oril SA, Paris	95.5 %
Benzaldehyd	Merck, Darmstadt	97.9 %
1-Octen-3-on	Silesia, Neuss	90.4 %
D,L-1-Octen-3-ol	Fluka, Neu-Ulm	92.2 %

Zu Tab. 3, S.16 :

- *) Bestimmung durch Headspace-Adsorption / GC-Analyse
 - **) enthielt 21.1 % p-Cymol
-

1.4.2 Quantitative Analyse

Für die quantitative Analyse (s. IV.7.2) wurden folgende Chemikalien verwendet :

- Standardsubstanzen :
 - (a) (+)- Δ -3-Caren, puriss., > 99 % (GC); Fluka, Neu-Ulm
 - (b) Pentan-1-ol, 99 %; Aldrich-Chemie, Steinheim
- Lösungsmittel :
 - (a) n-Pentan, nanograde; Promochem, Wesel
 - (b) Isopropanol, p.a.; Baker, Deventer, Niederlande

2. Biologischer Test

2.1 Testraum, Testarena

Alle biologischen Tests wurden in einem völlig abgedunkelten, geruchsneutralen Raum bei $27 \pm 1^\circ \text{C}$ durchgeführt. Die eigentliche Testanordnung (s. 2.2 und 2.3) befand sich dabei in einer an der Vorderseite offenen Arena aus milchweißem Plexiglas (LxBxH : 85x45x70 cm; Abb. 5, S. 18).

Als einzige Lichtquelle während der Tests dienten drei auf dem "Dach" der Arena montierte Leuchtstoffröhren (L 18 W/25 weiß, 60 cm lang), die am Boden der Arena ein einheitliches, diffuses Licht von etwa 500 Lux erzeugten.



Abb. 5: Testarena aus Plexiglas mit Strömungsmessern und Dreizack-Anordnung (s. Text)

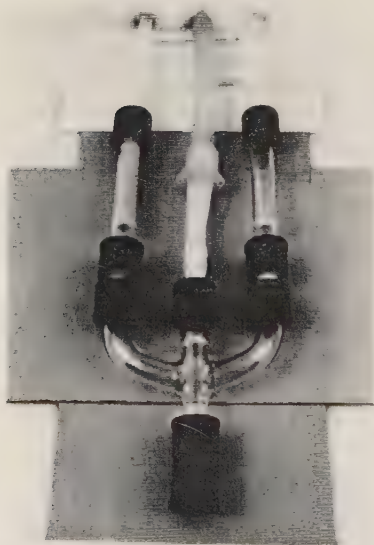


Abb. 12: Dreizack-Anordnung (Type A)

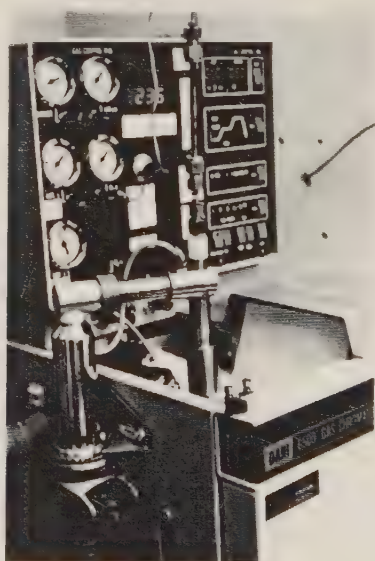


Abb. 21: Gaschromatograph mit Heizpatrone zur thermischen Desorption

2.2 Vorversuche zur Testanordnung

2.2.1 Glastunneltest

Die Anordnung für den Glastunneltest nach Saxena und Rembold [48] bestand aus einer Glasröhre und einem dazu passenden Schälchen aus Glas (Abb. 6).

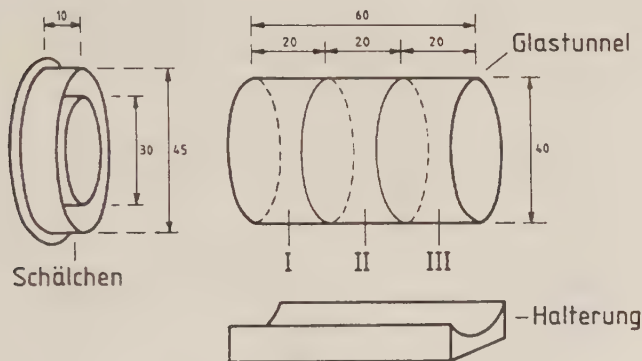


Abb. 6: Anordnung für den Glastunneltest nach Saxena und Rembold [48]. Maße in mm.

Die Glasröhre wurde durch 2 Markierungsringe in 3 gleich große Sektoren (I,II,III) unterteilt und in einer geeigneten Halterung in horizontaler Lage fixiert. Zum Test schob man die Glasröhre zwischen die beiden Glasringe des Schälchens, um so ein Röhrenende zu schließen, während das andere Ende offen blieb.

Das durch den inneren Glasring gebildete Schälchen (Durchmesser : 30 mm, Tiefe : 10 mm) diente der Aufnahme der zu testenden Stoffe (Gesamthexanextrakt von *Cicer arietinum*-Samen und die entsprechenden HPLC-Unterfraktionen, s.3.1.1): dazu ließ man zunächst 1 ml einer 10%igen Lösung von Vaselinum album (DAB 8; Caesar & Loretz, Hilden) in n-Hexan (p.a.; Merck, Darmstadt) eintrocknen, pipettierte 0.5 bzw. 1.0 ml des zu testenden Extraktes auf den Vaselinefilm und ließ erneut das Lösungsmittel abdunsten.

Zur Durchführung des Tests brachte man mit Hilfe eines feinen Pinsels 10 L_1 in den mittleren Sektor der Glasröhre und beobachtete deren Verhalten, bis entweder alle Tiere eine Entscheidung getroffen hatten oder 15 min seit dem Einsetzen der L_1 verstrichen waren.

Als Entscheidung wurde dabei das Erreichen eines Tunnel-

endes gewertet : auf der Seite des Glasschälchens als positive Antwort [+], am offenen Tunnelende als negative Antwort [-]. Beim Erreichen eines Tunnelendes wurden die L_1 entfernt. Offensichtlich inaktive Larven ersetzte man nach 7 min durch neue L_1 ; Tiere, die sich bis zum Testende nicht entschieden hatten, wurden als inaktiv [Ø] gewertet.

2.2.2 Modifizierter Glastunneltest

Die Anordnung für den modifizierten Glastunneltest zeigt Abb. 7.

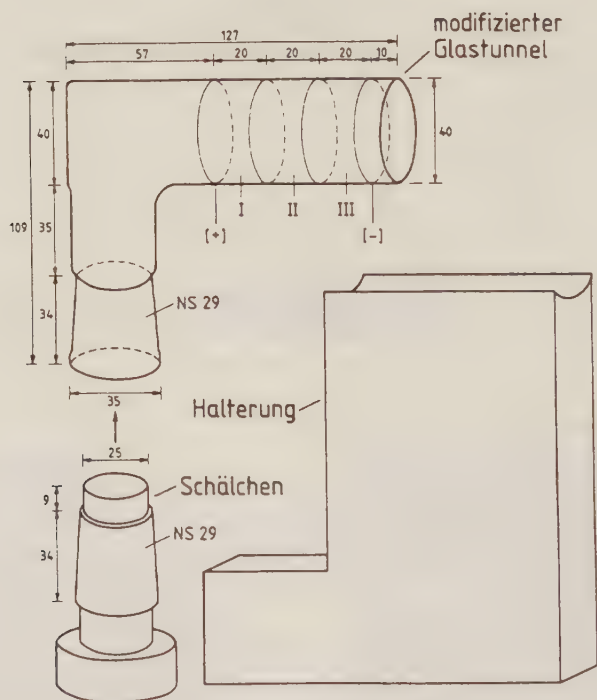


Abb. 7: Anordnung für den modifizierten Glastunneltest.
Maße in mm.

Ein Glastunnel mit den gleichen Maßen und Einteilungen wie oben beschrieben bildete einen Schenkel der L-förmigen Anordnung; das Glasschälchen (Durchmesser: 25 mm, Tiefe: 9 mm) für den Substanzauftrag befand sich auf einem NS 29 Schliffstopfen, der in den anderen Schenkel der Anordnung eingeführt werden konnte. Das Schälchen war nach dem Einsetzen der ganzen Anordnung in die Halterung (Abb. 7) vom Tunnel aus nicht einsehbar.

Die zu testenden Extrakte wurden wie oben beschrieben aufgetragen; auf Grund der horizontalen Anordnung des Schälchens konnte auch trockenes *Cicer arietinum*-Samenmehl als Testmaterial verwendet werden.

Die Durchführung der Tests erfolgte wiederum mit L_1 , wie beim Glastunneltest (2.2.1) beschrieben; das Erreichen der äußeren Sektorengrenzen ([+] und [-] in Abb. 7) wurde als positive bzw. negative Antwort gewertet.

2.2.3 Y-Olfaktometer

Abb. 8 zeigt die Glasbauteile, Abb. 9 die gesamte Anordnung des Y-Olfaktometers.

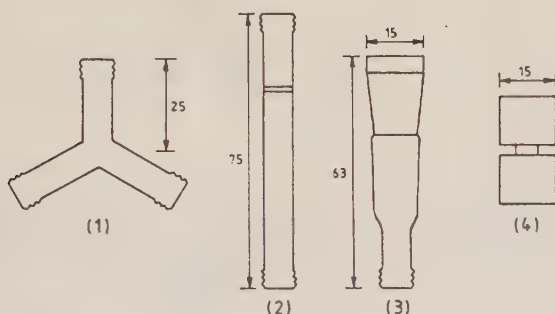


Abb. 8: Bauteile für das Y-Olfaktometer. Maße in mm. Alle Glasgewinderöhren: i.D. = 8 mm, ä.D. = 12 mm.
(1) Y-Stück; (2) Probenröhrchen mit Glasfritte;
(3) Ansatzrohr; (4) Schraubkupplung.

Alle Bauteile der Abb. 8 stammten aus einem Wheaton-Glasgewindebausatz (Vertrieb: Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt am Main). Das Kernstück der Anordnung (Abb. 9) bildete dabei das Y-förmige Teil (8), das an einem Schenkel über eine Schraubverbindung (7) mit einem Glasrohr (9) zum Einsetzen der Testlarven gekoppelt war. Als Geruchsquellen dienten 2 Glasfrittenröhrchen (5,6), die mit je ca. 2.5 g Kichererbsenmehl bzw. P-Cellulose (Serva, Heidelberg) gefüllt und an die beiden anderen Schenkel des Y-Stücks angeschlossen waren. Die Glasfritten verhinderten dabei den Sichtkontakt von den Testtieren zur Duftquelle.

Durch die beiden Frittenröhrchen wurde jeweils ein angefeuchteter (2) und über Nadelventile (4) regulierbarer Strom von Preßluft (1) in das Y-Stück geleitet. Zu den Strömungsverhältnissen s. IV.2.3.

Es wurden Larven des letzten Stadiums einzeln zum Test eingesetzt. Nach dem Einführen in das Glasrohr beobachtete man das Verhalten der Larve und bewertete ein Erreichen des Substanz- bzw. Kontrollröhrchens als positive [+] bzw. nega-

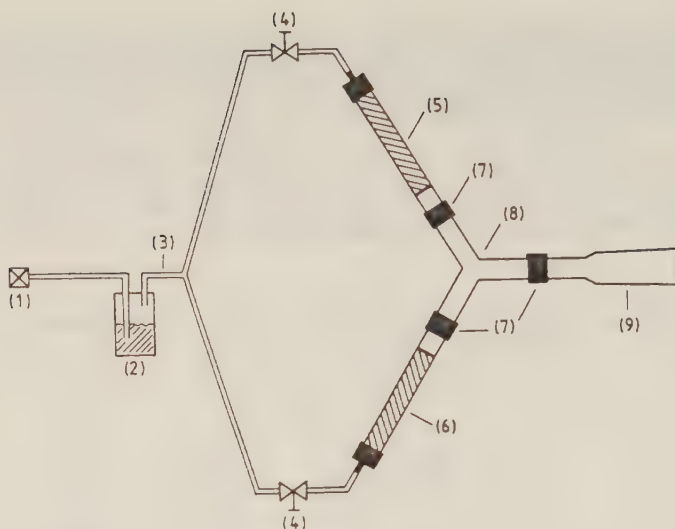


Abb. 9: Anordnung für Larventests mit dem Y-Olfaktometer (schematisch). (1) Preßluft; (2) Waschflasche mit Leitungswasser; (3) Silikonschlauch; (4) Nadelventile; (5,6) Glasfrittenröhrchen; (7) Schraubverbindungen; (8) Y-Stück; (9) Glasrohr.

tive [-] Antwort, eine Wendung des Tieres oder ein Verharren an einer Stelle für mehr als 4 Minuten dagegen als inaktives Verhalten [ø].

2.3 "Dreizack"-Anordnung

Mit Hilfe der Dreizack-Anordnung wurden 2 Arten von Larventests durchgeführt : 1.) mit Kichererbsenmehl als Geruchsquelle (Typ A) und 2.) mit von Tenaxröhrchen desorbierten flüchtigen Stoffen als Duftquelle (Typ B). Der unterschiedliche Aufbau für diese 2 Testarten wird im folgenden beschrieben.

2.3.1 "Dreizack" (Typ A) : Tests mit Kichererbsenmehl

Glasbauteile

Alle Glasbauteile und Schraubverbindungen der "Dreizack"-Anordnung wurden aus einem Duran-Glasgewinde-Bausatz (Schott, Mainz) hergestellt. Die einzelnen Bauteile zeigt Abb.10: das Kernstück der Anordnung bildete der "Dreizack" mit einer Glasfritte im mittleren Schenkel. Die beiden seitlichen Arme waren über Schraubkupplungen mit den Probenröhrchen verbunden.

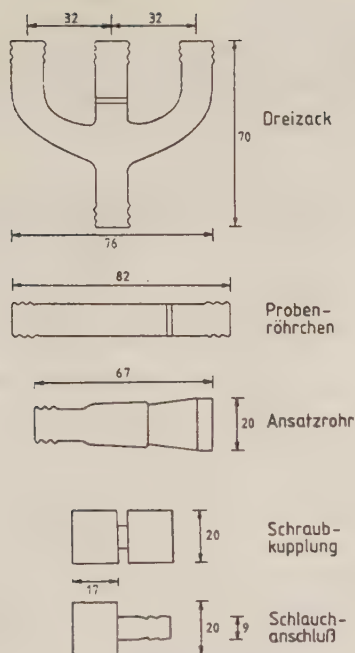


Abb. 10: Bauteile der Dreizack-Anordnung. Maße in mm.
Alle Glasgewinderöhren :
i.D. = 9 mm, ä.D. = 12 mm.

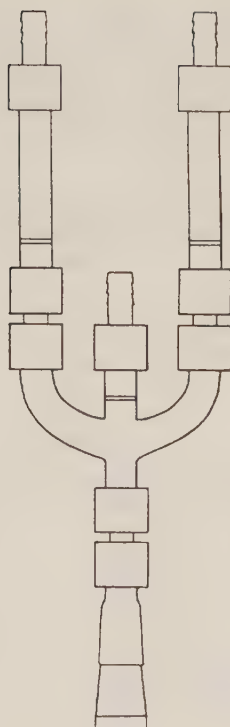


Abb. 11: Dreizack-Anordnung
(Typ A), schematisch

Beim Test mit L₁ setzte man die Tiere direkt in das vordere Ende des Dreizacks ein, das anschließend mit einer Schraubkupplung abgedunkelt wurde; bei Tests mit L₅ diente ein zusätzlich angebrachtes Ansatzrohr dem leichteren Einführen der Tiere.

Die Schläuche für die Luftversorgung (s.u.) wurden über Schraubkappen mit Oliven an die 3 Arme des Dreizacks angeschlossen. Die gesamte Dreizack-Anordnung kam während des Tests auf dem Boden der Testarena (s. 2.1) zu liegen, wobei die gesamte Laufstrecke der Larven mit gelbem Karton unterlegt war.

Abb.11 zeigt schematisch die komplette Dreizack-Anordnung für den Test mit L₃ (mit Ansatzrohr), die Abb.12, S. 18, dagegen die in der Arena montierte Anordnung für den Test mit L₁ (ohne Ansatzrohr).

Luftversorgung

Der gesamte Testaufbau einschließlich der Luftversorgung ergibt sich aus Abb. 13 (schematisch).

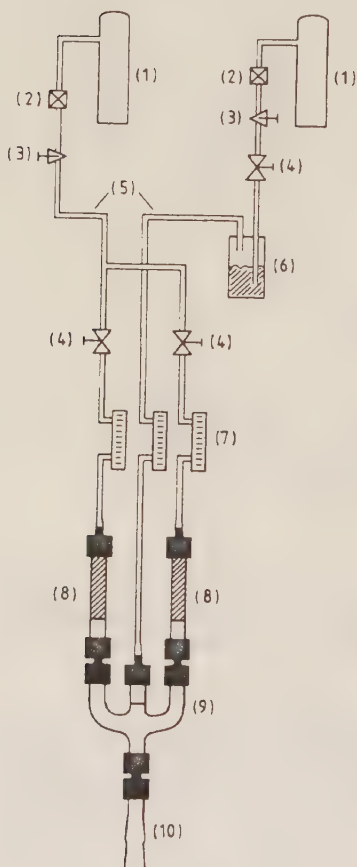


Abb. 13: Testaufbau der Dreizack-Anordnung (Typ A), (schematisch). (1) synthetische Luft; (2) Absperrhahn; (3) Reduzierventil; (4) Nadelventil; (5) Silikon-schlauch; (6) Waschflasche mit Leitungswasser; (7) Strömungsmesser; (8) Probenröhrchen; (9) Dreizack; (10) Ansatzrohr.

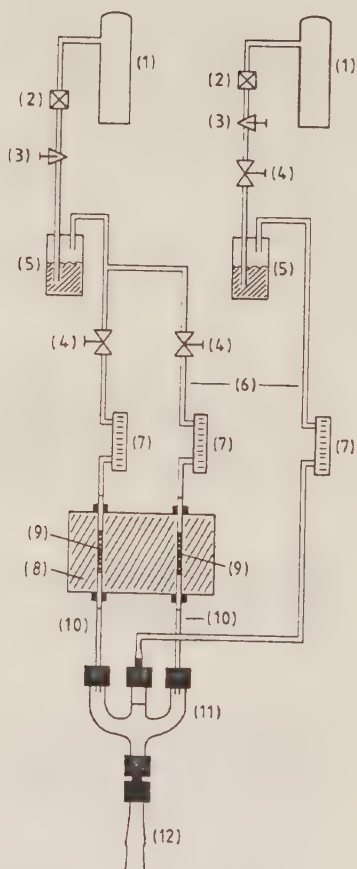


Abb. 14: Testaufbau der Dreizack-Anordnung (Typ B), (schematisch). (1) synthetische Luft; (2) Absperrhahn; (3) Reduzierventil; (4) Nadelventil; (5) Waschflasche mit Leitungswasser; (6) Silikon-schlauch; (7) Strömungsmesser; (8) Wasserbad mit Thermostat; (9) Tenax-Adsorptionsröhrchen; (10) Teflonschlauch; (11) Dreizack; (12) Ansatzrohr.

Die beiden seitlichen Arme des Dreizacks waren an eine Druckflasche (1) mit synthetischer Luft (80% N_2 , 20% O_2 ; Linde, München) angeschlossen; der Luftstrom wurde in 2 Teilströme aufgetrennt, diese über Nadelventile (4) reguliert und die Flüsse in Strömungsmessern (7) überwacht. Von dort gelangte die Luft durch die beiden Probenröhrchen (8) in den Dreizack (9).

Die Versorgung des mittleren Schenkels des Dreizacks erfolgte ebenfalls mit synthetischer Luft und wie oben beschrieben; zusätzlich wurde dieser Luftstrom jedoch in einer Waschflasche (6) mit Leitungswasser angefeuchtet.

Die Luftströmungen wurden auf 170 ml/min im mittleren Schenkel und je 15 ml/min in den beiden seitlichen Armen des Dreizacks eingestellt.

Versuchstiere : L_s , s.1.2.2

Test- und Kontrollsubstanzen

Als Testsubstanz diente in allen derartigen Tests Kichererbsenmehl (KEM, s. 1.3.3), als Kontrolle dagegen je nach Testreihe ein leeres Probenröhrchen, KEMV oder KEMVW (s.1.3.4).

Von allen Mehlen (KEM, KEMV, KEMVW) füllte man dabei je 3.0 g in die Probenröhrchen, verschloß diese luftdicht und setzte sie nach 2-stündigem Temperieren auf 28° C in die Testapparatur ein. Nach dem Anschalten der 3 Luftströmungen wartete man 5 Minuten, um anschließend 1 Stunde lang zu testen. Für den nächsten Test mußten dann die Substanz- und Kontrollröhrchen erneuert werden.

In jeder Testreihe vertauschte man nach der Hälfte der Tests die Substanz- und Kontrollseite.

2.3.2 Tests mit Tenax-Adsorptionsröhrchen (Typ B)

Gegenüber der oben beschriebenen Anordnung (Typ A) ergaben sich folgende Änderungen (vgl. Abb. 14, S. 24) :

Desorptionsbad für Tenax-Adsorptionsröhrchen

2 Tenax-Adsorptionsröhrchen (s.3.2.1; (9) in Abb. 14) konnten in ein Wasserbad (8) eingeschraubt und dort auf 38° C temperiert werden. Die beiden Tenaxröhrchen wurden an Stelle der 2 Frittenröhrchen in die seitlichen Luftströme eingebaut.

Luftversorgung

Der mittlere Luftstrom blieb unverändert; die beiden seitlichen Luftströme wurden jetzt ebenfalls über eine Waschflasche (5) mit Leitungswasser angefeuchtet und nach den Strömungsmessern (7) in die Tenaxröhrchen (9) geleitet. Die Luftströmungen betrugen für Tests mit L_s 170 ml/min im mittleren und je 13 ml/min in den beiden seitlichen Armen,

während der Tests mit L_1 dagegen 25 ml/min in der Mitte und je 11 ml/min im linken und rechten Schenkel.

Glasbauteile

Die beiden Probenröhrchen entfielen; statt dessen wurden die von den Tenaxröhrchen desorbierten Stoffe über Teflonschläuche (i.D.: 4.75 mm; Labomatic, Sinsheim; (10) in Abb. 14) in den Dreizack (11) geleitet; ihre Befestigung erfolgte durch Schraubkappen mit teflonbeschichteten Silikondichtungen.

Versuchstiere

L_5 (aus der normalen Zucht oder vom "Luzerne/Soja-Stamm") oder L_1 (vgl.1.2).

Testsubstanzen

Als Geruchsquellen wurden in diesen Tests mit flüchtigen Substanzen (Kichererbsen-Gesamtaroma oder synthetische Stoffe) beladene Tenax-Adsorptionsröhrchen verwendet. Die Adsorption des Gesamtaromas aus gemahlenen *Cicer arietinum*-Samen erfolgte dabei wie unter 3.2 beschrieben; zur Probenahme synthetischer Stoffe s.3.3.

Als Kontrolle dienten stets unbeladene, frisch ausgeheizte Tenax-Adsorptionsröhrchen. Alle Tenaxröhrchen wurden vor dem Test in verschlossenem Zustand 2 Stunden lang auf 28° C temperiert und zur Desorption während des Tests in das obige Wasserbad (38° C) eingesetzt.

Nach dem Anschalten der 3 Luftströmungen wartete man wiederum 5 Minuten, um anschließend 40 Minuten lang zu testen. Vor dem nächsten Test wurden dann die Tenaxröhrchen erneuert. In jeder Testreihe vertauschte man nach der Hälfte der Tests die Substanz- und Kontrollseite.

2.3.3 Durchführung und Bewertung der Tests

Tests mit L_5

Die Tiere wurden individuell zum Test eingesetzt. Man führte die Larve in das Ansatzrohr ein und beobachtete deren Verhalten, bis das Tier eine Entscheidung getroffen hatte, längstens jedoch 4 Minuten. Die Dauer eines Tests betrug je nach Duftquelle 60 min (KEM) bzw. 40 min (beladene Tenaxröhrchen); es kamen daher pro Test etwa 27 bzw. 20 L_5 zum Einsatz.

Legten die Tiere eine Strecke von mindestens 3 cm, gerechnet vom Mittelpunkt des Dreizacks aus, in einem der seitlichen Arme zurück, so wurde dies auf der Substanzseite als positive [+], auf der Kontrollseite als negative Antwort [-] gewertet. Das Erreichen der Fritte im mittleren Schenkel des Dreizacks galt als neutrales Verhalten [±]; Tiere, die sich länger als 3 Minuten nicht fortbewegten, wurden als inaktiv [ø] bezeichnet.

Tests mit L₁

Die Tiere wurden in Gruppen zu 5 L₁ direkt in das vordere Ende des Dreizacks eingeführt und danach deren Verhalten beobachtet, bis entweder mindestens 4 L₁ eine Entscheidung getroffen hatten oder 5 Minuten vergangen waren.

Bei einer Testdauer von 40 min konnten 30 L₁ (6 Gruppen zu 5 L₁) getestet werden. Das Zurücklegen einer Laufstrecke von mindestens 2 cm (vom Kreuzungsmittelpunkt aus gerechnet) in den linken oder rechten Arm des Dreizacks wurde als positive [+] (Substanzseite) bzw. negative Antwort [-] (Kontrollseite) gewertet, alle anderen Tiere als inaktiv [ø].

Alle Versuchstiere (sowohl L₁ als auch L₅) wurden nur einmal im Test eingesetzt.

Eine Übersicht über die wichtigsten Parameter der verschiedenen Testarten mit der Dreizack-Anordnung findet sich in Tab. 4.

Tab. 4 : Übersicht über die wichtigsten Parameter der verschiedenen Testarten mit der Dreizack-Anordnung

Test-substanzen *)		Test-tiere	Dreizack Typ	Fluß **) (ml/min)	Testdauer (min)
KEM	- KTR.	L ₅	A	15/170/15	60
T(KEM)	- T(LEER)	L ₅	B	13/170/13	40
T(KEM)	- T(LEER)	L ₁	B	11/ 25/11	40
T(SYNTH)	- T(LEER)	L ₁	B	11/ 25/11	40

*) KEM: Kichererbsenmehl; KTR.: Leerröhrchen, KEM, KEMV oder KEMVW; T(KEM): Tenaxröhrchen, beladen mit Kichererbsengesamtaroma; T(LEER): unbeladenes Tenaxröhrchen; T(SYNTH): Tenaxröhrchen, beladen mit Referenzsubstanzen

**) Strömung synthetischer Luft im linken/mittleren/rechten Schenkel des Dreizacks

2.3.4 Reinigung der Testapparatur

Alle benützten Glasbauteile, Kunststoffverbindungen und Teflonschläuche wurden nach jedem Test ausgetauscht, mit Wasser und Aceton bzw. Isopropanol gründlich gereinigt und über Nacht bei 140° C ausgeheizt. Die Probenröhrchen wurden darüber hinaus nach jedem Test mit rauchender Salpetersäure behandelt; das Ausheizen der Tenax-Adsorptionsröhrchen erfolgte wie unter 3.2.1 beschrieben. Das Leitungswasser in den Waschflaschen wurde täglich gewechselt, sämtliche Leitungen der Anordnung wurden vor den Tests mehrere Stunden lang mit synthetischer Luft gespült.

2.4 Auswertung der biologischen Tests

Sowohl für jeden Einzeltest, als auch für jede Testreihe konnten angegeben werden :

- die Anzahl der insgesamt getesteten Tiere : $[\Sigma]$
- die Anzahl der Tiere, die sich bezüglich der Geruchsquelle positiv bzw. negativ entschieden hatten : $[+]$ bzw. $[-]$
- die Anzahl der aktiven Tiere : $([+] + [-])$

2.4.1 Präferenzwert (PW)

Als Maß für die Reaktion der Tiere auf einen angebotenen Geruchsreiz wurde daraus auf der Basis der aktiven Tiere der Präferenzwert (PW) berechnet:

$$PW = \frac{([+] - [-])}{([+] + [-])} \times 100$$

Aus den Präferenzwerten der Einzeltests ließ sich für jede Testreihe der entsprechende Mittelwert mit dem zugehörigen Standardfehler errechnen. In den Vorversuchen zur Testanordnung erfolgte die PW-Berechnung nur für die Gesamtergebnisse der Testreihen.

2.4.2 Aktivität A

Die Aktivität (A) der Larven wurde für jeden Einzeltest als prozentualer Anteil der Tiere, die eine Entscheidung getroffen hatten, an der Anzahl der insgesamt zum Test eingesetzten Tiere angegeben :

$$A = \frac{([+] + [-])}{([\Sigma])} \times 100$$

Für die Testreihen konnten daraus wiederum Mittelwert und Standardfehler berechnet werden; für die Vorversuche gilt das oben Gesagte.

2.4.3 Signifikanztest (χ^2 -Test)

Mit Hilfe des χ^2 -Tests wurden die im Larventest beobachteten Verteilungen der Tiere auf signifikante Abweichungen von der Null-Hypothese (s.u.) geprüft; die Berechnungen und Auswertungen erfolgten dabei nach Sokal und Rohlf [59] und Precht [60].

Null-Hypothese

Zeigten die angebotenen Duftstoffe keine Wirkung auf die Larven, so war zu erwarten, daß sich die gleiche Anzahl von Tieren zur Substanz- und zur Kontrollseite orientieren würde ; daraus ergab sich die Null-Hypothese $H_0 : [+] = [-]$.

Prüfgröße χ^2 , Signifikanzschranken

Die Formel zur Berechnung der für den χ^2 -Test notwendigen Prüfgröße χ^2 ließ sich im vorliegenden Fall (1 Freiheitsgrad, erwartete Verteilung = 1:1) vereinfachen zu :

$$\chi^2 = \frac{([+] - [-])^2}{([+] + [-])}$$

Diese Prüfgröße χ^2 ist χ^2 -verteilt; daher ergaben sich für die Irrtumswahrscheinlichkeiten P von 5%, 1% und 0.1% aus der χ^2 -Verteilung für 1 Freiheitsgrad folgende Signifikanzschranken :

P = 0.05	→	$\chi^2 = 3.84$
P = 0.01	→	$\chi^2 = 6.64$
P = 0.001	→	$\chi^2 = 10.83$

Zur Kennzeichnung der unterschiedlichen Signifikanz-Niveaus wurden folgende Symbole verwendet :

n.s.	:	nicht signifikant
(*)	:	$0.01 < P \leq 0.05$
(**)	:	$0.001 < P \leq 0.01$
(***)	:	$P \leq 0.001$

3. Chemische Analytik

3.1 Vorversuche zur Probenahmetechnik

3.1.1 Soxhlet-Extraktion, HPLC-Fraktionierung (modifiziert nach Saxena und Rembold [48])

Eine Charge der handelsüblichen *Cicer arietinum*-Samen wurde gewaschen, geschält, getrocknet und in einer IKA-M-20 Universalmühle (Janke & Kunkel, Staufen) unter intensiver Wasserkühlung gemahlen. Pro Ansatz wurden 100 g des Mehls zur kontinuierlichen Soxhlet-Extraktion (26 h) mit n-Hexan p.a. (Merck, Darmstadt) bei 31° C Badtemperatur und vermindertem Druck (250 mbar) verwendet.

Das Einengen des Extraktes auf 50 ml (1 ml $\cong$ 2 g Mehl) erfolgte an einer verspiegelten Vakuummantel-Vigreuxkolonne bei einer Badtemperatur von 38° C und einem Druck von 260 mbar (Rücklaufverhältnis $\geq$ 2:1).

Anschließend wurden 25 ml dieses Extraktes an einer präparativen HPLC-Anlage fraktioniert:

- Pumpe : GILSON (Villiers le Bel, Frankreich), Modell 303
- Säule : Kieselgel 10 μ m (Macherey-Nagel, Düren); 200x54 mm
- Detektor : UV-Detektor Pye-Unicam LC 3 (Philips, Kassel), $\lambda = 214$ nm

Die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten aus n-Hexan p.a. (Merck) und Diethylether p.a. (Merck) bei einem Fluß von ca. 70 ml/min :

- 90% Hexan : 10% Ether, 36 min $\rightarrow$ Fraktion 1
- 80% Hexan : 20% Ether, 36 min $\rightarrow$ Fraktion 2
- 70% Hexan : 30% Ether, 20 min $\rightarrow$ Fraktion 3
- 100% Ether, 20 min $\rightarrow$ Fraktion 4

Alle 4 Fraktionen wurden an einer verspiegelten Vakuummantel-Füllkörperkolonne auf 25 ml eingengt (Badtemperatur: 31-35° C, Druck: 680-210 mbar, je nach Zusammensetzung). Bei Fraktion 4 setzte man dabei 100 ml n-Hexan zu, so daß nach dem Einengen alle Fraktionen in n-Hexan gelöst vorlagen (Konzentration: 1 ml $\cong$ 2 g Mehl).

Vom Soxhlet-Extrakt und den 4 HPLC-Fraktionen wurden Absorptionsspektren im UV- und sichtbaren Bereich an einem Photometer (Gilford; Oberlin, Ohio, USA) aufgenommen.

3.1.2 Perforation

1.0 kg gewaschene und getrocknete Kichererbsen-Samen der Standardsorte wurden unter intensiver Wasserkühlung gemahlen (IKA-M-20-Mühle) und 5 h lang unter Rühren mit 1.2 l frisch destilliertem Methanol p.a. (Merck) extrahiert. Das Filtrat dieses Ansatzes (480 ml) wurde mit der gleichen Menge bidestillierten Wassers versetzt, vom entstandenen Niederschlag abfiltriert und mit einem frisch hergestellten Azeotrop aus n-Pentan und Dichlormethan (beide: nanograde; Promochem, Wesel) 8 h lang perforiert (54° C Badtemperatur).

Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wurde der Azeotrop-Extrakt (ca. 80 ml) an einer verspiegelten Vakuummantel-Vigreuxkolonne (Badtemperatur: 45° C, Normaldruck, Rücklaufverhältnis > 3:1) auf ca. 1 ml eingengt. Dieses Konzentrat wurde für die GC-Untersuchung verwendet.

3.1.3 Headspace-Adsorption, Flüssigdesorption

Die Adsorptionsröhrchen aus Glas (20 cm x 4 mm i.D.), gefüllt mit ca. 800 mg Porapak Q (80-100 mesh; Serva, Heidelberg), wurden durch Ausheizen bei 240° C für 20h im Stickstoffstrom konditioniert. Das Reinigen der Porapak-Röhrchen vor der Adsorption erfolgte durch Eluieren mit je 150 ml frisch destilliertem Ether p.a. (Merck) und anschließendem Ausheizen über Nacht bei 190° C und 25-30 ml N₂/min.

5.2 kg getrockneter *Cicer arietinum*-Samen (Standardsorte) wurden unter intensiver Wasserkühlung gemahlen (IKA-M-20-Mühle) und das Mehl in 8 Portionen zu je 650 g in Probenrohre aus Glas (40 cm x 8 cm i.D.) überführt, diese horizontal in ein Wasserbad eingesetzt und auf 43° C temperiert.

Zur Headspace-Adsorption wurde in die 8 Probenrohre nacheinander (1h pro Rohr) über ein Porapak-Röhrchen Stickstoff (140 ml/min) eingeblasen, über die Mehloberfläche geleitet und am anderen Ende über ein Porapak-Adsorptionsröhrchen wieder abgeführt. Jeweils nach 2 Probenrohren wechselte man die Porapak-Vor- und -Adsorptionsröhrchen.

Die durch Elution mit je 50 ml frisch destilliertem Ether p.a. (Merck) aus den 4 Adsorptionsröhrchen gewonnenen Eluate wurden vereinigt und nach dem Einengen an einer verspiegelten Vakuummantel-Vigreuxkolonne auf 2 ml zur GC-Untersuchung eingesetzt.

Die analoge Behandlung von gespülten und frisch ausgeheizten Porapakröhrchen lieferte ein entsprechendes Blindeluat.

3.2 Headspace-Adsorption flüchtiger Verbindungen aus gemahlenden *Cicer arietinum*-Samen an Tenax

3.2.1 Adsorptionsröhrchen

20 cm lange Glasröhrchen (6 mm Außen-, 4 mm Innendurchmesser) wurden mit je 150 mg Tenax TA (80-100 mesh; Chrompack, Müllheim) gefüllt (Abb. 15). Die Tenax-Packung war dabei so zwischen 2 Stopfen aus silanisierter Glaswolle (Alltech, Unterhaching) angeordnet, daß sie nach dem Montieren des Röhrchens auf das GC-Injektorteil (s.u.) in der Heizzone der Heißluftpatrone für die thermische Desorption lag. An einem Ende mit einem Glasstopfen verschlossene kurze Stücke Teflonschlauch (i.D.: 4.75 mm; Labomatic, Sinsheim) dienten zum dichten Verschließen der Adsorptionsröhrchen.

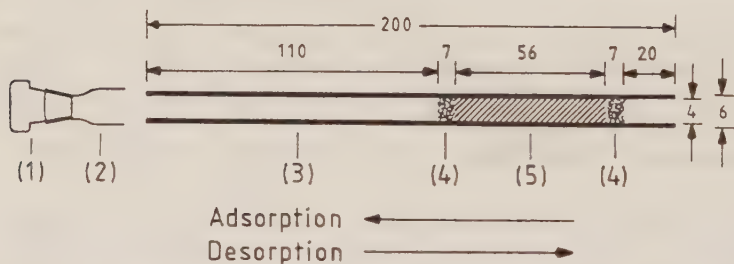


Abb. 15: Tenax-Adsorptionsröhrchen. Maße in mm. (1) Glasstopfen; (2) Teflonschlauch; (3) Glasrohr; (4) Stopfen aus silanisierter Glaswolle; (5) Tenax-Packung.

Vor dem erstmaligen Gebrauch wurden alle Tenax-Adsorptionsröhrchen 24 h lang bei 250° C in einem N₂-Strom (nachgereinigter Stickstoff; Linde, München) in Desorptionsrichtung ausgeheizt. Vor jeder weiteren Probenahme genügte ein Ausheizen unter den gleichen Bedingungen für 1h.

3.2.2 Probenahmegefäß

Die zur Probenahme verwendeten Glasgeräte zeigt Abb. 16.

Der Dreihalskolben hatte ein Volumen von ca. 110 ml. Die NS 29-Öffnung diente zum Einfüllen des Samenmehls, die beiden NS 14-Öffnungen zum Einblasen des Stickstoffs bzw. zum Einsetzen des Adsorptionsröhrchens. Die Röhrchen wurden dabei mit Hilfe von durchbohrten, teflonbeschichteten Silikon-dichtungen (Schott, Mainz) und GL-14-Schraubkappen (Schott, Mainz) dicht in den Adapter eingeschraubt.

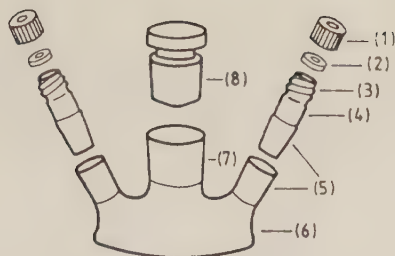


Abb. 16: Glasgeräte zur Headspace-Probenahme von *Cicer arietinum*-Samenmehl. (1) GL-14-Schraubkappe; (2) Durchbohrte, teflonbeschichtete Silikondichtung; (3) GL-14-Schraubgewinde; (4) Adapter; (5) NS 14; (6) Dreihalskolben; (7) NS 29; (8) NS-29-Stopfen.

Alle zur Probenahme benutzten Teile, einschließlich der Schraubkappen und Dichtungen, wurden vor Gebrauch gründlich gesäubert und über Nacht bei 140° C ausgeheizt.

3.2.3 Probenahme

25 g *Cicer arietinum* - Samen wurden 40 sec lang unter intensiver Wasserkühlung gemahlen (IKA-M-20 Universalmühle; Janke & Kunkel, Staufen). Das Mehl wurde sofort in einen Probenahme Kolben überführt und in einem Wasserbad bei 43° C 10 min lang temperiert.

Nach dem Einsetzen der beiden Tenax-Röhrchen (Vor- und Adsorptionsröhrchen) erfolgte dann bei unveränderter Badtemperatur die Headspace-Probenahme (Dauer: 15 min). Hierzu wurde nachgereinigter Stickstoff (100 ml/min) durch einen Teflonschlauch und das Tenax-Vorröhrchen in den Kolben geleitet; das Gas passierte die Oberfläche des Mehls und wurde über das Adsorptionsröhrchen wieder aus dem Kolben abgeführt. Ein Stopfen aus silanisierter Glaswolle vor dem Adsorptionsröhrchen verhinderte dabei, daß Mehlpartikel in das Röhrchen gelangten. Der Gasfluß konnte über ein Reduzierventil geregelt und mit einem Strömungsmesser (Supelchem, Sulzbach) überwacht werden.

Die gesamte Anordnung zeigt Abb. 17, die Probenahmebedingungen sind in Tab. 5 zusammengefaßt.

Tab. 5: Bedingungen der Headspace-Probenahme von gemahlenen *Cicer arietinum*-Samen

Mehl	: 25 g	Adsorption	: 15 min
Badtemperatur	: 43 ° C	Verwendetes Gas	: Stickstoff
Temperieren	: 10 min	Strömung	: 100 ml/min

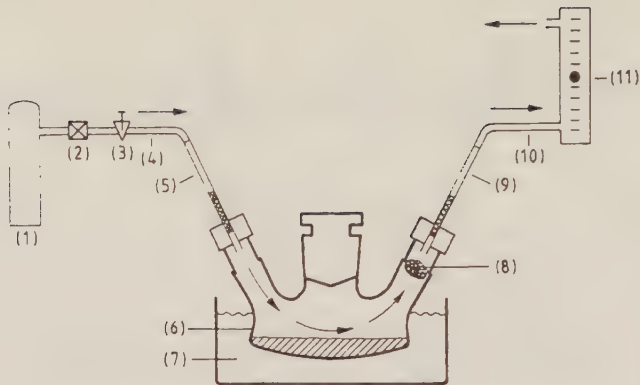


Abb. 17: Anordnung zur Headspace-Probenahme von *Cicer arietinum*-Samenmehl (schematisch). (1) N_2 , nachgereinigt; (2) Absperrhahn; (3) Reduzierventil; (4) Teflonschlauch; (5) Tenax-Vorröhrchen; (6) Probenahme-kolben; (7) Wasserbad mit Thermostat; (8) silani-sierte Glaswolle; (9) Tenax-Adsorptionsröhrchen; (10) Silikonschlauch; (11) Strömungsmesser.

3.2.4 Anordnung mit 2 Adsorptionsröhrchen

In einem speziellen Versuch (s.IV.5.5) wurde zwischen dem (Primär-) Adsorptionsröhrchen und dem zum Strömungsmesser führenden Silikonschlauch noch ein zweites Tenax-(Sekundär)-Adsorptionsröhrchen angebracht. Primär- und Sekundärröhrchen wurden dabei mit einem kurzen Stück Teflonschlauch verbunden.

3.3 Headspace-Adsorption synthetischer Stoffe an Tenax

3.3.1 Adsorptionsröhrchen : s.3.2.1

3.3.2 Probenahmegefäß

Als Probenahmegefäße dienten kleine Rundkolben (Volumen: ca. 17 ml) mit 3 GL-14-Schraubgewindeansätzen (Schott, Mainz) (Abb. 18). In die beiden seitlichen Ansätze wurden die Tenax-Röhrchen wie oben beschrieben dicht eingeschraubt; die mittlere Öffnung wurde mit einem GC-Septum (S.G.E., Weiterstadt) und einer GL-14-Schraubkappe (Schott, Mainz) dicht verschlossen.

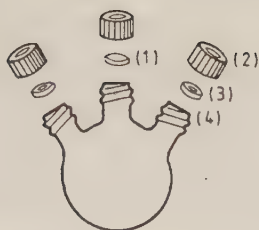


Abb. 18: Gefäß für die Headspace-Probenahme synthetischer Stoffe. (1) GC-Septum; (2) GL-14-Schraubkappe; (3) Durchbohrte, teflonbeschichtete Silikondichtung; (4) GL-14-Schraubgewinde.

3.3.3 Probenahme

Zur Probenahme wurden die 3 ml-Probengläschen mit den Referenzsubstanzen durch Septumkappen gasdicht verschlossen. Ein Wasserbad mit Thermostat erlaubte ein Temperieren der Proben auf Temperaturen zwischen 20 und 100° C.

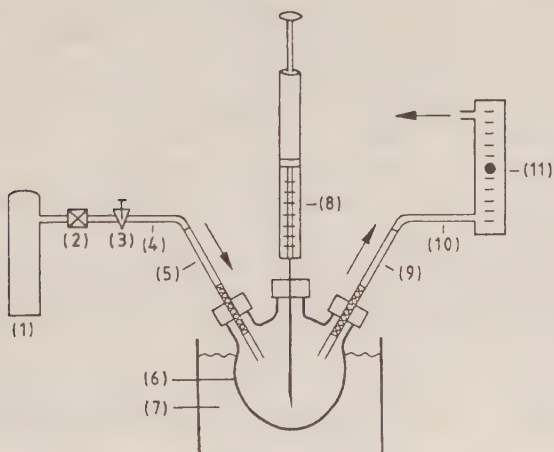


Abb. 19: Anordnung zur Headspace-Probenahme synthetischer Stoffe (schematisch). (1) N_2 , nachgereinigt; (2) Absperrhahn; (3) Reduzierventil; (4) Teflonschlauch; (5) Tenax-Vorröhrchen; (6) Probenahmekolben; (7) Wasserbad mit Thermostat; (8) 10 μ l-GC-Spritze; (9) Tenax-Adsorptionsröhrchen; (10) Silikonschlauch; (11) Strömungsmesser.

Zur Probenahme-Anordnung vgl. Abb. 19. Nach dem Temperieren des Probenahmekölbchens im Wasserbad auf 43° C für 10 min wurde ein Tenax-Vorröhrchen eingeschraubt und das Kölbchen 3 min lang mit nachgereinigtem Stickstoff bei einem Fluß von ca. 60 ml/min gespült. Nach dem Einsetzen des Tenax-Adsorptionsröhrchens wurde mit Hilfe einer gasdichten 10 µl-GC-Spritze (Typ 1801; Hamilton, Reno, Nevada, USA) ein definiertes Volumen Headspace einer Referenzsubstanz aus dem im Wasserbad geeignet temperierten Probengläschen entnommen und durch das GC-Septum in das Probenahmekölbchen injiziert. Der N₂-Fluß betrug dabei unverändert ca. 60 ml/min.

3.4 Gaschromatographie, thermische Desorption

Für die gaschromatographischen Analysen wurden 2 Geräte benützt (GC I und II). GC I konnte sowohl zur Injektion flüssiger Proben (3.4.1) als auch zur thermischen Desorption von Tenax-Adsorptionsröhrchen (3.4.2) verwendet werden; GC II wurde nur für eine Analyse (vgl. IV.4.3) benötigt und wird in 3.4.3 beschrieben.

3.4.1 GC I, Gerätedaten ("Normalbetrieb")

- Gerät : DANI 6500 HR (DANI, Monza, Italien).
- Trennsäule : WCOT Fused Silica-Kapillarsäule (Länge: 25 m, i.D.: 0.32 mm), Trennphase: CP-Sil 8 CB (chemisch gebundene Phase, entspricht SE 54), Filmdicke: 1.2 µm, Hersteller: Chrompack, Müllheim.
- Trägergas : Helium, 1.2 ml/min (entsprechend 24 cm/sec) bei 60° C Ofentemperatur, Split: 1:70.
- Detektor : Flammenionisationsdetektor (FID); H₂: 40 ml/min, Luft: 300 ml/min, Make-up-Gas (N₂): 30 ml/min.
- Injektor : PTV (Programmable Temperature Vaporizer) mit Glasinsert (50 x 0.9 mm i.D.) und Septumkappe für die Injektion flüssiger Proben; Anfangs- und Endtemperatur beliebig wählbar.
- Integrator : SP 4100 (Spectra Physics, Darmstadt).

Ofen-, Detektor- und PTV-Temperatur: s. jeweilige Analyse.

3.4.2 GC I, thermische Desorption

Die für den thermischen Desorptionsbetrieb notwendigen Veränderungen und Ergänzungen wurden entsprechend den Arbeiten von Nitz et.al. [61] und Wächter et.al. [62] ausgeführt (vgl. Abb. 20, S. 38 und Abb. 21, S. 18).

- (1) Das normale Glasinsert des PTV-Injektors wurde ersetzt durch ein Vorsäulchen aus Glas (60 x 1.8 mm ä.D.), gefüllt mit 5% OV 101 auf Chromosorb W (100-120 mesh; WGA, Griesheim) zwischen 2 Stopfen aus silanisierter Glaswolle. Die Füllung war dabei so angebracht, daß sie in der Kühl- bzw. Heizzone des PTV-Injektors zu liegen kam (s. Abb. 20).
- (2) An Stelle der normalen Septumkappe wurde ein Injektor-Einlaßteil direkt auf den PTV-Injektor aufgeschraubt. In die obere Öffnung dieses Einlaßteils wurde das untere Ende des Tenax-Adsorptionsröhrchens eingesetzt. Durch die Bohrung des Einlaßteils ragte die Vorsäule bis in das Tenaxröhrchen (s. Abb. 20).
- (3) Desorptionsheizung : Zum Aufheizen der Tenax-Packung während der thermischen Desorption diente eine Heißluftpistole. Diese wurde direkt über dem Injektoreinlaßteil so montiert, daß das Tenaxröhrchen auf allen Seiten von der heißen Luft umspült wurde. Die Temperaturmessung und -regulierung erfolgte über einen Pt-100-Fühler in diesem Luftstrom (s. Abb. 20).
- (4) Desorptionsgas : durch ein zusätzliches Magnetventil konnte zwischen der normalen Trägergaszufuhr im Injektorblock und einer Trägergaszufuhr von oben durch das Adsorptionsröhrchen (Desorptionsgas) umgeschaltet werden.
- (5) Kühlsystem : Flüssiger Stickstoff aus einem Vorratsgefäß (Dewar TD 35A; L'Air liquide, Champigny, Frankreich), in dem über eine regulierbare elektrische Widerstandsheizung ein Überdruck von 0.5 bar erzeugt werden konnte, diente zur Kühlung sowohl des GC-Ofens als auch des PTV-Injektors. Beide Funktionen wurden über vom GC aus steuerbare Magnetventile in den N₂-Zuleitungen kontrolliert.
- (6) Das Split-Verhältnis wurde auf etwa 1:20 reduziert (bei gleichem Trägergasfluß wie oben).
- (7) Trägergas : vor dem GC wurde das Trägergas über 3 Gasfilter (Chrompack, Müllheim) zur Entfernung von Wasser, Sauerstoff und organischen Verunreinigungen geleitet. Unmittelbar vor dem Eintritt des Trägergases in den Injektor bzw. des Desorptionsgases in das Adsorptionsröhrchen wurde jeweils ein zusätzlicher Aktivkohlefilter angebracht.

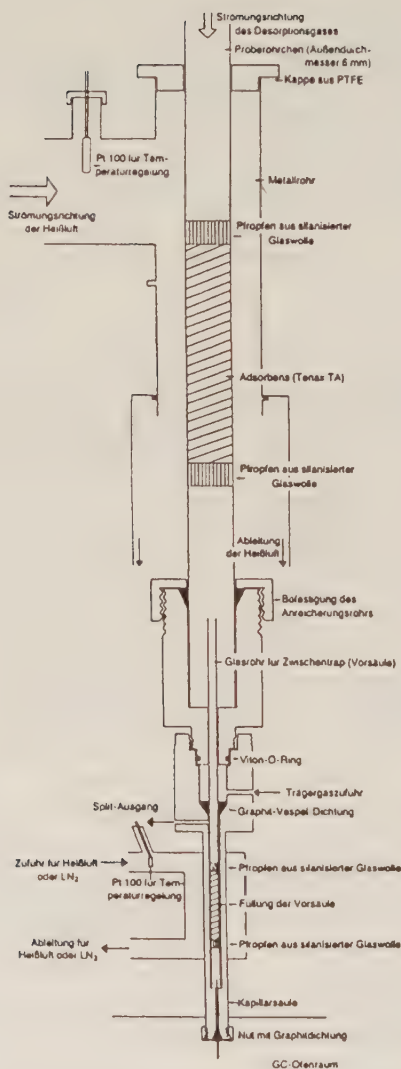


Abb. 20: GC-Probenaufgabesystem für die thermische Desorption (nach Wächter et.al. [62]). Erläuterungen s. Text.

Analysenablauf

- Vor dem Start der Analyse : das zu desorbierende Tenaxröhrchen wurde auf dem Einlaßteil montiert und am oberen Ende mit dem Anschluß für das Desorptionsgas verbunden; der PTV-Injektor wurde auf -150°C , der Ofen auf 0°C abgekühlt.
- Start der Analyse (0.min) : es wurde von der normalen Trägergaszufuhr auf das Desorptionsgas umgeschaltet, das Split-Ventil wurde geöffnet und die Desorptionspatrone auf 150°C aufgeheizt.
- Thermische Desorption (0.-10.min) : die auf dem Tenaxröhrchen angereicherten Stoffe wurden desorbiert, vom Desorptionsgas (ca. 20 ml He/min) auf die Vorsäule gespült und dort bei -150°C festgehalten.
- Ende der Desorption (10.min) : das Desorptionsgas wurde durch das normale Trägergas ersetzt, das Split-Ventil geschlossen und die Vorsäule im PTV in ca. 15 sec auf 250°C aufgeheizt.
- Dosierung von der Vor- auf die Kapillarsäule (10.-12.min) : die schlagartig verdampften Probenkomponenten wurden durch den normalen Trägergasstrom (1.2 ml He/min) von der Vorsäule splitlos auf die Kapillarsäule gespült.
- Start der Trennung (12.min) : das Split-Ventil wurde wieder geöffnet und das Temperaturprogramm für den GC-Ofen gestartet: von 0°C mit $2^{\circ}/\text{min}$ bis 120°C , dann mit $5^{\circ}/\text{min}$ bis 220°C , dort isotherm für 7 min.

Alle Zeit-, Schalt- und Heizfunktionen wurden vom Mikroprozessor des GC gesteuert; der Detektor blieb während der gesamten Analyse auf 250°C . Tab. 6 faßt die Analysenbedingungen nochmals zusammen:

Tab. 6: Übersicht über die Analysenbedingungen bei der thermischen Desorption

Funktion	Analysenzeit (min)		
	0 - 10	10 - 12	12 - 99
Gaszufuhr *)	Des.	Tr.	Tr.
Split-Ventil	auf	zu	auf
Desorptionsheizung	+ 150°C	aus	aus
PTV-Injektor	- 150°C	+ 250°C	+ 250°C
Detektor (FID)	+ 250°C	+ 250°C	+ 250°C
Ofen	0°C	0°C	$0 \rightarrow 220^{\circ}\text{C}$

*) Des. = Desorptionsgas; Tr. = Trägergas

3.4.3 GC II, Gerätedaten

- Gerät : SiCHROMAT 2 (Siemens, München); Doppelofen-GC zur Kopplung einer gepackten Säule mit einer Kapillarsäule über ein Totaltransferstück, das ein kurzes, kühl- und beheizbares GC-Vorsäulchen zur Zwischenanreicherung enthielt (Oreans et.al.[63]).
- Gepackte Säule : Glassäule (1 m x 2 mm i.D.), gefüllt mit 3% CP-Sil 5 auf Chromosorb WHP, 100-120 mesh (Chrompack, Müllheim).
- Kapillarsäule : Fused Silica-Säule (25 m x 0.22 mm i.D.), Phase: CP-Sil 5 CB (chemisch gebunden, entspricht SE 30), Filmdicke: 0.12 µm; (Chrompack, Müllheim).
- Trägergas : Helium; Flüsse: gepackte Säule: 30 ml/min (50° C Ofentemperatur), "Split": 4 ml/min (50° C), Kapillarsäule: 0.5 ml/min (120° C).
- Injektor : 200° C.
- Detektor : FID; 200° C.
- Temperaturprogramm Ofen 1 : 50° C für 3 min, 10°/min bis 150° C, danach 150° C isotherm.
- Trap-Zeit : 3.-15.min (Überführung von der gepackten Säule in die mit flüssigem Stickstoff gekühlte Falle).
- Dosier-Zeit : 15.-16.min (Dosierung von der Falle auf die Kapillarsäule durch Aufheizen der Falle auf 250° C)
- Temperaturprogramm Ofen 2 : 50° C für 19 min, 2°/min bis 150° C.
- Integrator : SP 4100 (Spectra Physics, Darmstadt).

3.5 Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

Die GC/MS-Analysen wurden im Institut für Lebensmitteltechnologie und Analytische Chemie der TU München in Freising-Weihenstephan durchgeführt.

- Gerät : Finnigan 1020 Automated GC/MS (Finnigan, Bremen); Quadrupol-Massenspektrometer direkt gekoppelt mit Gaschromatograph Sigma III (Perkin-Elmer, Überlingen).
- Injektor : PTV-Injektor, wahlweise benutzbar für normale Injektion flüssiger Proben oder für thermische Desorption (s.3.4.2): Desorptionstemperatur: 220° C (10 min), PTV: -150° C (Kühlphase), sonst 200° C.
- Säule : J & W Fused Silica-Kapillarsäule (30 m x 0.25mm i.D.), flüssige Phase: DB-5 (entspricht SE 54),

quervernetzt und chemisch gebunden, Filmdicke: $0.25 \mu\text{m}$;
(Vertrieb: ict, Frankfurt).

- Trägergas : Helium, 29 cm/sec bei 60° C Ofentemperatur.
- Temperaturprogramm (thermische Desorption) : 0° C für 12 min , $2^\circ/\text{min}$ bis 250° C .
- Transferlinie : 250° C .
- Ionisierungsenergie : 70 eV .
- Kathodenstrom : $25\text{--}30 \mu\text{A}$.

Aufnahme der Massenspektren mit Computersystem NOVA 4, Abspeicherung auf CDC Disk drive System; Auswertung über NBS-Library (32000 Spektren) und interne Kovatsindexkartei.

3.6 Desorption flüchtiger Stoffe von Tenax unter den Bedingungen des Biotests

Die Anordnung zur Desorption flüchtiger Stoffe von Tenax unter den Bedingungen und mit den Geräten des Biotests zeigt Abb. 22.

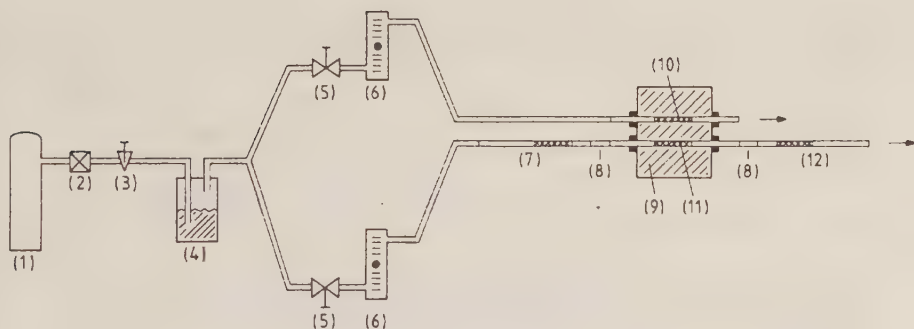


Abb. 22: Anordnung zur Desorption flüchtiger Stoffe von Tenax unter Biotest-Bedingungen (schematisch).
(1) synthetische Luft; (2) Absperrhahn; (3) Reduzierventil; (4) Waschflasche mit Leitungswasser; (5) Nadelventil; (6) Strömungsmesser; (7) Tenax-Vorröhrchen; (8) Teflonschlauch; (9) Wasserbad mit Thermostat; (10) Tenax-Blindröhrchen; (11) Tenaxröhrchen mit adsorbierten flüchtigen Stoffen; (12) Tenaxröhrchen zur Readsorption desorbierter Stoffe.

Das Tenax-Röhrchen mit den adsorbierten flüchtigen Stoffen aus *Cicer arietinum*-Samen (11) wurde in einem Wasserbad (9) auf 38° C temperiert. Die desorbierten Stoffe wurden von einem Strom (13 ml/min) angefeuchteter (4) synthetischer Luft (1), der über ein Nadelventil (5) reguliert, in einem Strömungsmesser (6) kontrolliert und über ein Tenax-Vorröhrchen (7) gereinigt wurde, abgeführt und in einem nachgeschalteten Tenax-Adsorptionsröhrchen (12) bei Raumtemperatur wieder adsorbiert. Die Tenaxröhrchen waren dabei mit kurzen Teflonschlauchstücken (8) verbunden.

IV. Ergebnisse

A. Biologischer Teil

1. Qualität und Auswahl der Versuchstiere

Die Entwicklung von *H. armigera* in der Laborzucht (s. III.1.1) wurde unter jenen Gesichtspunkten näher untersucht, die für die Qualität bzw. Charakterisierung der Versuchstiere von Bedeutung waren.

1.1 Einzelhaltung der Larven

Einerseits sollte bei der Larvenaufzucht die angebotene Diät möglichst effektiv verwertet werden (möglichst viele Tiere pro Larvenkasten), andererseits sollte ein eventueller negativer Einfluß einer zu hohen Populationsdichte auf die Qualität der Larven vermieden werden.

Je 4 Larvenkästen mit Kichererbsendiät wurden daher unter ansonsten identischen Bedingungen mit 1, 3 bzw. 5 L_1 /Zelle (entsprechend 40, 120 oder 200 L_1 /Kasten) bestückt, die Larvenentwicklung beobachtet und Anzahl und Gewicht der erhaltenen Puppen bestimmt (Tab. 7).

Tab. 7: Entwicklung der *H. armigera*-Larven in der Laborzucht auf halbsynthetischem Futter mit 1, 3 und 5 L_1 /Zelle

L_1 /Zelle	:	5	3	1
L_1 /Kasten	:	200	120	40
Verpuppungsrate (%) *)	:	37 $\pm$ 3.6	51 $\pm$ 2.9	93 $\pm$ 2.1
Puppengewicht (mg) **)	:	309 $\pm$ 2	339 $\pm$ 5	377 $\pm$ 6

*) Mittelwert $\pm$ Standardfehler (n=4)

**) Durchschnittsgewicht, Mittelwert $\pm$ Standardfehler (n=4)

Aus diesen Ergebnissen ging eindeutig hervor, daß ausschließlich beim Einsetzen nur einer L_1 /Zelle akzeptable Resultate hinsichtlich der Verpuppungsrate und des Puppengewichts erreicht werden konnten; daher wurden im Labor alle Larven in Einzelhaltung aufgezogen (vgl. dazu V.1.2).

1.2 Entwicklungszyklus von *H. armigera* in der Laborzucht

Ein genaues Studium des Lebenszyklus von *H. armigera* im Labor, vor allem eine exakte Bestimmung der Anzahl, der Dauer und der charakteristischen Merkmale der einzelnen Entwicklungsstadien war unerlässlich für die Auswahl geeigneter Versuchstiere.

Eine Gruppe von 37 Tieren wurde daher unter den geschil-
derten Zuchtbedingungen in ihrer Entwicklung vom befruchteten
Ei bis zur erneuten Eiablage der Adulten beobachtet.
Tab. 8 listet auf, wie viele Tiere (als prozentualer Anteil
an der Gesamtpopulation) sich zu einem gegebenen Zeitpunkt
in den jeweiligen Entwicklungsstadien befanden. Die fünf
Larvenstadien (s.u.) konnten dabei an Hand der Kopfkapsel-
durchmesser eindeutig voneinander unterschieden werden.

Tab. 8: Entwicklungszyklus von *H. armigera* in der Laborzucht

		% - Anteil der Entwicklungsstufen an der Gesamtpopulation							
Tag	Eier	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₅	Puppe	♀♀	♂♂
1- 3	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
4- 6	-	100.0	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	100.0	-	-	-	-	-	-
8	-	-	78.4	21.6	-	-	-	-	-
9	-	-	-	100.0	-	-	-	-	-
10	-	-	-	21.6	78.4	-	-	-	-
11	-	-	-	-	100.0	-	-	-	-
12	-	-	-	-	24.3	75.7	-	-	-
13-16	-	-	-	-	-	100.0	-	-	-
17	-	-	-	-	-	89.2	10.8	-	-
18	-	-	-	-	-	32.4	67.6	-	-
19	-	-	-	-	-	2.7	97.3	-	-
20-27	-	-	-	-	-	-	100.0	-	-
28	-	-	-	-	-	-	97.3	2.7	-
29	-	-	-	-	-	-	91.9	8.1	-
30	-	-	-	-	-	-	64.9	35.1	-
31	-	-	-	-	-	-	40.5	48.7	10.8
32	-	-	-	-	-	-	18.9	51.4	29.7
33-35	-	-	-	-	-	-	10.8	51.4	37.8
36	XXX *)	-	-	-	-	-	8.1	51.4	40.5

*) Erste Ablage befruchteter Eier der nächsten Generation

Die mittlere Generationszeit (Zeit von der Eiablage bis
zur erneuten Ablage befruchteter Eier durch die ♀♀ der
Nachfolgeneration) lag bei 41.5 Tagen (35-48 Tage). Für
die mittlere Dauer der einzelnen Stadien ergab sich :

Ei : 3.0 Tage

L₁ : 3.0 Tage

L₂ : 1.8 Tage

Larve : 14.2 Tage

L₃ : 1.4 Tage

L₄ : 2.0 Tage

L₅ : 6.0 Tage

Puppe : 12.7 Tage

Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit entsprechenden Werten
aus der Literatur erfolgt unter V.1.2; hier sollen nur einige
das Larvenstadium betreffende Beobachtungen angemerkt
werden, die für das weitere Vorgehen von Bedeutung waren:

- Die Larvenentwicklung wurde unter den gegebenen Bedingungen in nur 5 Larvenstadien vollendet.
- Die L_1 erwiesen sich als deutlich photopositiv.
- Innerhalb der einzelnen Larvenstadien zeigte die Entwicklung immer einen charakteristischen Verlauf : zu Beginn eines jeden Stadiums (nach einer kurzen Ruhephase unmittelbar nach dem Schlüpfen aus dem Ei bzw. nach der Häutung) waren die Larven sehr aktiv und nahmen häufig Nahrung auf, am Ende des 1.-4. Stadiums dagegen erwiesen sie sich als sehr träge, oft nahezu unbeweglich und ohne jede Fraßaktivität. Äußerlich wechselte währenddessen die Gestalt von einer schlanken zu einer dicklichen, plumpen Form; eine deutliche Vergrößerung des Abstandes zwischen Kopfkapsel und Nackenschild durch eine Ausdehnung der dazwischen liegenden Intersegmentalhaut konnte dabei als sicheres Anzeichen für eine unmittelbar bevorstehende Häutung gewertet werden.
- Eine Abweichung von diesem Verhalten gab es nur im letzten Larvenstadium : die L_5 stellten zwar nach 2-3 Tagen die Nahrungsaufnahme ein, blieben jedoch als Vorpuppen sehr aktiv und durchwühlten die Diät, um sich schließlich in diese einzugraben und dort zu verpuppen.

Wollte man zwei verschiedene Altersstufen von *H. armigera*-Larven im Test untersuchen, schienen demnach folgende Entwicklungsstufen besonders geeignet zu sein :

- (1) Einige Stunden alte L_1 ; zur Abtrennung der aktivsten Larven konnte deren photopositive Reaktion ausgenutzt werden.
- (2) Junge Larven eines höheren Stadiums, die zur Steigerung der Aktivität und besseren Synchronisierung nach der Häutung einige Stunden lang ohne Nahrung gehalten wurden (s.u.).

1.3 Gewichtszunahme im Larvenstadium; Hungertiere

Als Grundlage für Untersuchungen über Hungertiere sollte zunächst der Verlauf der Gewichtszunahme von *H. armigera*-Larven während ihrer normalen Entwicklung im Labor bestimmt werden.

Dazu wurde eine Gruppe von 23 Individuen unter den beschriebenen Bedingungen aufgezogen und während des Larven- und Puppenstadiums alle 24 h das Gesamtgewicht der 23 Tiere bestimmt, um daraus deren Durchschnittsgewicht zu errechnen; die Wägung von Einzeltieren erschien auf Grund des geringen Gewichts der L_1 und L_2 (Tag 1: 0.07 mg pro L_1 , Tag 4: 2.4 mg pro L_2) erst für ältere Tiere sinnvoll (s.u.).

Durchschnittliches
Larven-/Puppengewicht [mg]

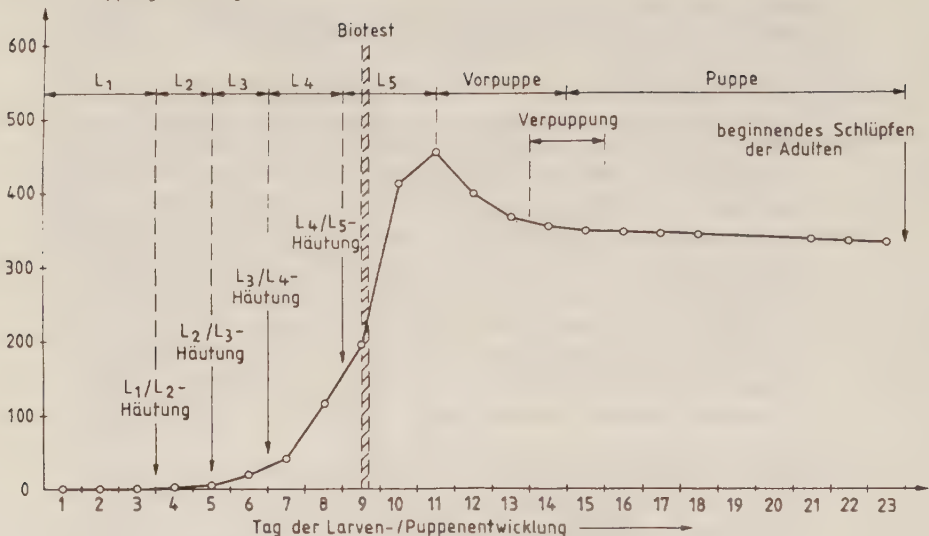


Abb. 23: Gewichtsverlauf bei *Heliothis armigera*-Larven und -Puppen während ihrer normalen Entwicklung im Labor

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abb. 23 graphisch dargestellt. Die Gewichtszunahme während der Larvenentwicklung zeigte einen exponentiellen Verlauf; der steilste Anstieg lag dabei am Beginn des letzten Larvenstadiums (Tage 9 und 10). Das Maximalgewicht (457 mg/L₅) wurde am Tag 11 erreicht, dann sank das Durchschnittsgewicht bis zur Verpuppung deutlich (ca. 350 mg/Puppe), danach langsam bis auf ca. 330 mg/Puppe ab.

Nach diesen Ergebnissen boten sich - neben den L₁ - junge L₅ als Versuchstiere für den Larventest an; üblicherweise entfernte man solche Larven im späten 4. Stadium kurz vor der Häutung (s.o.) von der Nahrung und ließ sie im Anschluß an die L₄/L₅-Häutung noch mehrere Stunden lang hungern. Dies führte zu einer besseren Synchronisierung der Tiere (Hegazi und Schopf [64]). Außerdem sollte das Hungern eine erhöhte Aktivität im Biotest bewirken (Visser [65]).

Um diese Vorgehensweise zu überprüfen, wurde ein zweiter Versuch zur Gewichtsentwicklung der Larven durchgeführt. Dazu wurden 20 Larven zunächst wie gewohnt bis ins 4. Stadium aufgezogen. Am 8. Tag der Larvenentwicklung (späte L₄, kurz vor der Häutung zu L₅) wurden die L₄ in 2 Gruppen mit gleichem Durchschnittsgewicht aufgetrennt: die Tiere der einen Gruppe ließ man bei ausreichender Versorgung mit Feuchtigkeit 24 Stunden lang hungern und bot danach wieder Diät an (Hungertiere), während die andere Gruppe kontinuierlich auf der Diät gehalten wurde (Kontrolltiere).

Vom 6. Tag der Larvenentwicklung an bis zur vollständigen Verpuppung aller Tiere wurden die Larven ein- oder zweimal täglich individuell gewogen und das Durchschnittsgewicht sowie der zugehörige Standardfehler bestimmt. Die Ergebnisse zeigt Abb. 24.

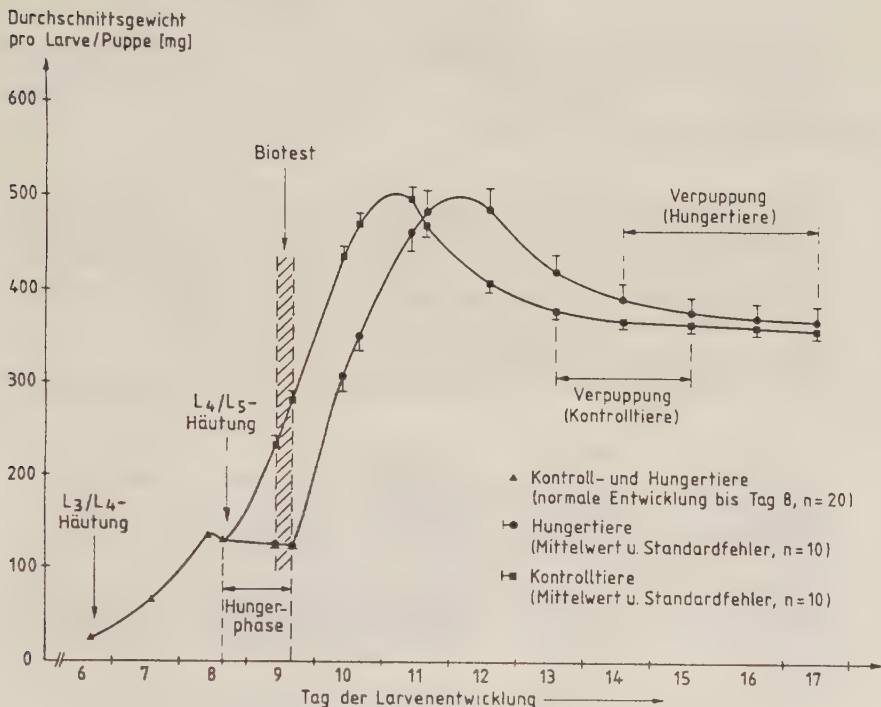


Abb. 24: Gewichtsverlauf von *Heliothis armigera*-L₄ und -L₅ mit und ohne Hungerphase am Beginn des 5. Stadiums

- Die geringfügige Gewichtsabnahme kurz vor der L₄/L₅-Häutung entsprach der beobachteten Phase der Inaktivität (s.o.), die der Erkennung der bevorstehenden Häutung diente.
- Zum Zeitpunkt des Biotests (s.Abb. 24) wiesen die Hungertiere (ca.125 mg/Tier) ein beträchtliches Gewichtsdefizit gegenüber den Kontrolltieren (ca.260 mg/Tier) auf. Der Biotest fiel zeitlich in die Phase der raschesten Gewichtszunahme in der Kontrollgruppe.
- Die Versuchstiere wurden durch das 24-stündige Hungern offensichtlich nicht nachhaltig geschädigt; ihre Entwicklung verzögerte sich zwar im Vergleich zu den Kontrolltieren um etwa einen Tag, das Maximalgewicht, die Verpuppungsrate und das Puppengewicht erreichten jedoch

die gleichen Werte wie in der Kontrollgruppe.

Neben den L_1 wurden daher frisch gehäutete L_5 nach einer kurzen Hungerphase im Larventest eingesetzt (s.III.1.2).

2. Vorversuche zur Testanordnung

2.1 Glastunneltest

Mit Hilfe des Glastunneltests (s.III.2.2.1) nach Saxena und Rembold [48] sollte die Wirkung des Soxhlet-Hexanextraktes gemahlener *C. arietinum* - Samen und der entsprechenden HPLC - Unterfraktionen (s.III.3.1.1) auf *H. armigera*- L_1 untersucht werden. Tab. 9 faßt die Ergebnisse dieser Larven-tests zusammen.

Tab. 9: Ergebnisse von Glastunneltests mit L_1 . Erläuterungen s. Text.

Testsubstanz	Menge (ml)	Anzahl der L_1				PW (%) *)
		[Σ]	[+]	[-]	[ø]	
n-Hexan	0.5	60	24	25	11	- 2.0
Gesamtextrakt	0.5	70	40	8	22	+ 66.7
n-Hexan	1.0	80	33	35	12	- 2.9
Gesamtextrakt	1.0	200	162	36	2	+ 63.6
Fraktion 1	1.0	90	58	20	12	+ 48.7
Fraktion 2	1.0	80	52	21	7	+ 42.5
Fraktion 3	1.0	40	22	12	6	+ 29.4
Fraktion 4	1.0	40	29	8	3	+ 56.8
gelbes Papier	---	100	82	10	8	+ 78.3

*) PW: Präferenzwert, s. III.2.4.1

Dabei erwies sich das Lösungsmittel n-Hexan als inaktiv, während der Gesamtextrakt eine starke Attraktivität besaß; auch alle 4 HPLC-Fraktionen zeigten eine anziehende Wirkung, die jedoch in keinem Fall die des Gesamtextraktes erreichte.

Es fiel auf, daß der am stärksten gelb gefärbte Gesamtextrakt den höchsten Präferenzwert (PW) aufwies, die am schwächsten gelb gefärbte Fraktion 3 dagegen den niedrigsten Wert, während die Fraktionen 1, 2 und 4 bezüglich der Eigenfarbe und der Attraktivität im Test jeweils zwischen den obigen Extremen lagen. Zur Bewertung der gelben Eigenfarbe konnten die Absorptionsspektren der Extrakte im Wellenlängenbereich von 350-550 nm herangezogen werden (Abb. 25).

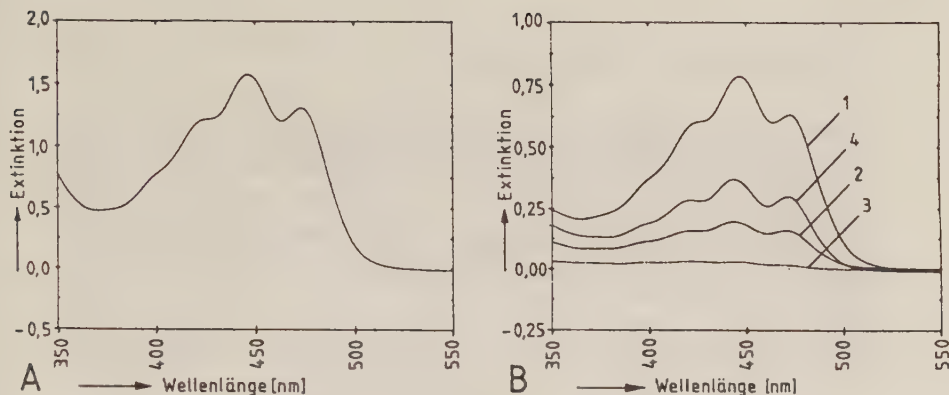


Abb. 25: UV/VIS - Absorptionsspektren (350-550 nm) des n-Hexan-Extraktes gemahlener *C. arietinum*-Samen (A) und der entsprechenden HPLC-Unterfraktionen 1-4 (B) (Gemessen wurden jeweils die unverdünnten Extrakte gegen n-Hexan).

Um zu überprüfen, ob die gelbe Farbe auf die Larven attraktiv wirkt, wurde das normalerweise für den Substanzauftrag verwendete Schälchen mit einem Stück gelben Papiers ausgekleidet. Im Test wählte man dabei die Anordnung so, daß der Boden des Glasschälchens zum Tunnel zeigte (Abb. 26); auf diese Weise konnten zwar die visuellen Reize, nicht jedoch eventuelle Geruchsreize die Larven erreichen (Saxena und Rembold [48]).

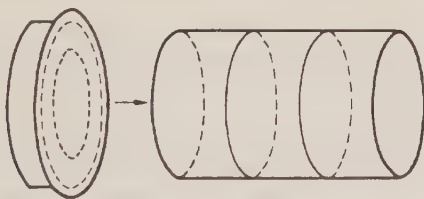


Abb. 26: Anordnung für den Glastunneltest auf visuelle Reize

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe (Tab. 9) belegten, daß die Larven im Glastunneltest stark auf visuelle Reize (gelbe Farbe) reagierten (PW: + 78%). Die Farbintensität des gelben Papiers war zwar wesentlich höher als die der getesteten Extrakt/Vaseline-Gemische, dennoch konnte auch für diese Extrakte ein Einfluß optischer Reize nicht ausgeschlossen werden.

Daher wurde angestrebt, die Glastunnelanordnung so zu modifizieren, daß eine Beeinflussung der Larven durch visuelle Reize prinzipiell unmöglich gemacht wurde.

2.2 Modifizierter Glastunneltest

Mit der Anordnung für den modifizierten Glastunneltest (s.III.2.2.2) wurden nach einer Reihe von Blindtests (leeres Substanzschälchen) sowohl der Gesamt - Hexanextrakt (s.III.3.1.1) gemahlener *C. arietinum*-Samen als auch das Samenmehl selbst (trocken oder mit etwas bidestilliertem Wasser angerührt) als Geruchsquellen - unter Ausschaltung der visuellen Reize - auf ihre Wirkung auf L_1 getestet. Die Ergebnisse zeigt Tab. 10.

Tab. 10: Ergebnisse von modifizierten Glastunneltests mit L_1

Testsubstanz	Menge	Anzahl der L_1				PW (%)
		[Σ]	[+]	[-]	[∅]	
Leer	---	100	31	15	54	+ 34.8
Gesamtextrakt	1.0 ml	60	14	13	33	+ 3.7
Samenmehl	1.0 g	150	46	29	75	+ 22.7

Diese Ergebnisse wiesen den modifizierten Glastunneltest aus folgenden Gründen als unbrauchbar aus :

- (1) Die unsymmetrische Anordnung des modifizierten Glastunneltests (ein offenes, ein geschlossenes Ende) hatte selbst, d.h. auch ohne Testsubstanz, einen ausgeprägten Einfluß auf das Verhalten der L_1 ; der Präferenzwert lag im Blindtest mit 35% sogar deutlich höher als für den Gesamtextrakt und das Kichererbsenmehl.
- (2) Das Verhalten der L_1 ließ in keiner Testreihe eine zielgerichtete Orientierung erkennen; die Testergebnisse waren großen Schwankungen unterworfen und schlecht reproduzierbar.
- (3) Die Aktivität der L_1 war im Vergleich zum Glastunneltest stark erniedrigt (im Mittel 47% aktive Larven gegenüber vorher 87%).

Die beiden letzten Punkte deuteten auf eine ungenügende und/oder schlecht reproduzierbare Ausbreitung des Geruchs von der Duftquelle in den Glastunnel hin. Zur Verbesserung des Tests ergaben sich somit vor allem 2 Forderungen :

- Der Testaufbau mußte völlig symmetrisch sein
- Die Ausbreitung des Geruchs mußte besser kontrollierbar gestaltet werden, d.h. der Geruch sollte durch eine definierte Luftströmung von der Duftquelle zu den Versuchstieren transportiert werden und nicht ausschließlich durch Diffusion (vgl.V.1.1).

2.3 Y - Anordnung

Im Y-Olfaktometer (s.III.2.2.3) wurde mit der Luftströmung ein weiterer Parameter in den biologischen Test eingeführt, dessen Auswirkungen auf die Larven untersucht werden mußten. Um das Verhalten der Tiere genauer beobachten zu können, wurden hierfür L_s individuell zum Test verwendet.

Da beim Zusammentreffen der beiden Luftströme im Y-Stück eine Verwirbelung und dadurch eine Vermischung und unkontrollierte Ausbreitung der Gerüche zu befürchten war, wurden zunächst einige Versuche durchgeführt, bei denen der eine Luftstrom doppelt so groß war wie der andere. Dadurch sollte sichergestellt werden, daß sich zumindest der Geruch der einen Seite (schwächere Strömung) nicht bis in den anderen Schenkel (stärkere Strömung) ausbreiten konnte (Tab. 11).

Tab. 11: Ergebnisse mit L_s im Y-Olfaktometer

Testsubstanz *)/ Strömung (ml/min)		Anzahl der L_s				PW (%)
[+]-Seite	[-]-Seite	[Σ]	[+]	[-]	[ø]	
CELL/ 40	CELL/ 80	18	12	4	2	+ 50.0
KEM / 40	CELL/ 80	59	47	5	7	+ 80.8
CELL/ 40	KEM / 80	26	14	7	5	+ 33.3
KEM / 55	CELL/ 55	17	7	2	8	+ 55.6
KEM / 55	CELL/ 55	22	4	10	8	- 42.9
KEM / 55	CELL/ 55	18	9	7	2	+ 12.5

*) KEM = Kichererbsenmehl, CELL = P-Cellulose, je ca. 2.5 g pro Röhrchen

Die Testreihe mit Cellulosepulver auf beiden Seiten zeigte, daß die L_s unter den gewählten Strömungsverhältnissen eindeutig den schwächeren von zwei angebotenen Luftströmen bevorzugten (PW = + 50%). Diese Präferenz wurde durch Kichererbsenmehl auf der Seite der schwächeren Strömung noch deutlich erhöht (PW = + 81%), durch KEM auf der Seite der stärkeren Strömung dagegen verringert (PW = +33%).

Dies legte den Schluß nahe, daß neben der Präferenz für den schwächeren Luftstrom auch eine Präferenz für KEM bestand und sich beide Effekte überlagerten.

Da die Stärke der Luftströmung das Verhalten der Larven erheblich beeinflusste, mußte eine optimale Testanordnung mit identischen Luftströmungen auf der Proben- und Kontrollseite arbeiten; Versuche mit dem Y-Olfaktometer unter diesen Bedingungen führten jedoch zu stark schwankenden, nicht reproduzierbaren Ergebnissen (s. Tab. 11).

Zur genaueren Untersuchung der Strömungsverhältnisse in der Y-Anordnung wurden mit Salzsäure bzw. wäßriger Ammoniaklösung getränkte Filterpapiere in einen der beiden Strömungswege gebracht und die Ausbreitung des sich bildenden NH_4Cl verfolgt; mit gleich starken Strömungen auf beiden Seiten (je 55 ml/min) ergab sich dabei das in Abb. 27 gezeigte Bild.

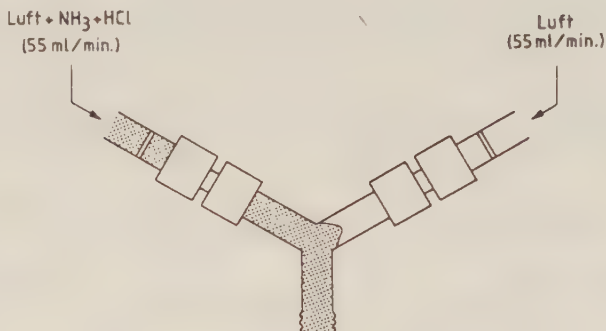


Abb. 27: Strömungsverhältnisse im Y - Olfaktometer

Es wurde somit die obige Vermutung voll bestätigt, daß am Kreuzungspunkt des Y eine klare Trennung der beiden Luftströme nicht gewährleistet war; vielmehr kam es zu Verwirbelungen und zur Ausbreitung eines Luftstromes bis in den gegenüberliegenden Arm des Y-Stücks.

Durch die Einführung eines dritten Strömungsweges sollte daher versucht werden, die für die Orientierung der Larven notwendige einwandfreie Trennung der beiden seitlichen Luftströme voneinander zu erreichen (s.u.).

3. Testergebnisse mit der "Dreizack"-Anordnung

3.1 Strömungsverhältnisse

In einem analogen Experiment mit NH_4Cl wurden die Strömungsverhältnisse in der Dreizack-Anordnung (s.III.2.3) unter den im Test mit L_3 angewandten Bedingungen untersucht.

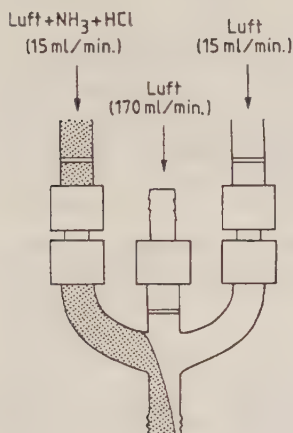


Abb. 28: Strömungsverhältnisse in der Dreizack - Anordnung für Tests mit L_3

Wie Abb. 28 zeigt, ergab sich in diesem Versuch eine äußerst scharfe Trennung zwischen "beladener" und "unbeladener" Luft. Der beladene Luftstrom reichte dabei in Höhe der Verzweigung des Dreizacks nicht einmal bis zu dessen Mittelachse, während er am Startpunkt der Larven die gesamte Breite des Glasrohres ausfüllte. Die Larven mußten also mit dem beladenen Luftstrom in Berührung kommen und hatten am Kreuzungspunkt eine eindeutige Wahl zwischen beladener und unbeladener Luft. Die Voraussetzungen für eine klare Orientierung der Larven waren somit gegeben.

3.2 Attraktivität des Kichererbsenmehls (KEM)

Mit der Dreizack-Anordnung (Typ A, s.III.2.3.1) sollte untersucht werden, ob flüchtige Stoffe aus gemahlene *C. arietinum*-Samen einen nachweisbaren Einfluß auf das Verhalten von *H. armigera*- L_3 ausübten, die auf einer Kichererbsen-Diät gezogen worden waren (vgl.V.2).

Hierzu wurden Probenröhrchen, gefüllt mit je 3.0 g Kichererbsenmehl (KEM), nach 2-stündigem Temperieren auf 28°C 1 Stunde lang gegen verschiedene Kontrollröhrchen getestet.

Testreihe I : KEM - KEM

In einer ersten Testreihe wurde zunächst überprüft, ob der Testaufbau Asymmetrien irgendeiner Art (Flüsse, Licht etc.) aufwies. Dazu wurde den Larven in 15 Blindtests auf beiden Seiten KEM angeboten und beobachtet, ob die Tiere eine Seite bevorzugten (Testreihe I: KEM-KEM, Tab. 12).

Tab. 12: Ergebnisse der Testreihe I (Übersicht)

Testtiere	: L _s	Substanz	: KEM [links]
Anordnung	: Typ A	Substanz	: KEM [rechts]
Zahl der Tests	: 15	[li] ¹⁾	: 115 L _s (50.6±3.3%)
[Σ]	: 436 L _s	[re] ¹⁾	: 117 L _s (49.4±3.3%)
Aktivität ¹⁾	: 53.1±2.1%	PW ¹⁾	: li. 1.2±6.7% n.s.

¹⁾ : Prozent-Angaben : Mittelwert ± Standardfehler (n=15)
n.s.: nicht signifikant (χ^2 -Test)

Die Ergebnisse zeigten, daß sich die L_s völlig gleichmäßig zwischen linker (115 Tiere) und rechter Seite (117 Tiere) verteilten; im Mittel ergab sich ein Präferenzwert von 1.2% für die linke Seite.

Testreihe II : KEM - Leerröhrchen

In einer Serie von 20 Tests wurde das Verhalten von Larven untersucht, denen auf der Substanzseite erneut KEM angeboten wurde, während sich dieses Mal auf der Kontrollseite ein leeres Probenröhrchen befand (Testreihe II: KEM-LEER, Tab. 13).

Tab. 13: Ergebnisse der Testreihe II (Übersicht)

Testtiere	: L _s	Substanz	: KEM [+]
Anordnung	: Typ A	Substanz	: LEER [-]
Zahl der Tests	: 20	[+] ¹⁾	: 218 L _s (84.3±2.0%)
[Σ]	: 523 L _s	[-] ¹⁾	: 42 L _s (15.7±2.0%)
Aktivität ¹⁾	: 49.9±2.2%	PW ¹⁾	: + 68.5±4.0% ***

¹⁾ : Prozent-Angaben : Mittelwert ± Standardfehler (n=20)
*** : P < 0.001 (χ^2 -Test)

Die Tiere zeigten unter diesen Umständen eine hoch signifikante Präferenz für das Kichererbsenmehl (Substanzseite: 218 Tiere, Kontrollseite: 42 Tiere); der Präferenzwert lag bei +69%.

Mögliche Einwände gegen die Verwendung eines leeren Probenröhrchens auf der Kontrollseite sind :

- Eventuell vorhandene abstoßende Geruchsstoffe aus der Testapparatur (z.B. von den Silikonschläuchen) könnten vom KEM zurückgehalten worden sein, während sie das Leerröhrchen ungehindert passieren konnten und durch ihre abstoßende Wirkung eine Attraktivität des KEM vor-täuschten.
- Die Strömungscharakteristik eines Luftstromes könnte nach dem Leerröhrchen von anderer Art sein als nach dem Passieren des dicht gepackten KEM-Röhrchens.

Testreihe III : KEM - KEMV

Aus diesen Gründen wurde in einer weiteren Testreihe vakuumbehandeltes Kichererbsenmehl (KEMV, s.III.1.3.4) als Kontrollsubstanz verwendet. KEMV unterschied sich von KEM lediglich durch die weitgehende Abwesenheit der flüchtigen, im Hochvakuum "extrahierbaren" Inhaltsstoffe und erschien somit gut als Vergleichssubstanz geeignet. In einer Folge von 12 Tests wurde daher den L_s auf der einen Seite KEM, auf der anderen Seite KEMV angeboten (Testreihe III, Tab. 14).

Tab. 14: Ergebnisse der Testreihe III (Übersicht)

Testtiere	: L _s	Substanz	: KEM [+]
Anordnung	: Typ A	Substanz	: KEMV [-]
Zahl der Tests	: 12	[+] ¹⁾	: 142 L _s (81.3±3.6%)
[Σ]	: 320 L _s	[-] ¹⁾	: 32 L _s (18.7±3.6%)
Aktivität ¹⁾	: 54.2±1.7%	PW ¹⁾	: + 62.5±7.2% ***

¹⁾ : Prozent-Angaben : Mittelwert ± Standardfehler (n=12)

*** : P < 0.001 (χ²-Test)

Auch unter diesen Umständen bevorzugten die Tiere eindeutig die Seite des Kichererbsenmehls (142 gegenüber 32 Larven, PW = +63%).

Als mögliche Fehlerquelle blieb somit noch der unterschiedliche Wassergehalt von KEM und KEMV, da die Präferenz der Larven für das KEM möglicherweise auf einer Attraktivität der höheren Feuchtigkeit beruhte. Obwohl den Testlarven während der dem Test vorausgehenden Hungerphase Wasser in ausreichendem Maß angeboten wurde, konnte ein derartiger Effekt zumindest nicht ausgeschlossen werden.

Testreihe IV : KEM - KEMVW

Vakuumbehandeltes Kichererbsenmehl, das auf den gleichen Wassergehalt eingestellt worden war (KEMVW, s.III.1.3.4), wie er in frischem Kichererbsenmehl vorlag, diente in einer weiteren Serie von 12 Tests als Kontrollsubstanz gegenüber KEM (Testreihe IV, Tab. 15).

Tab. 15: Ergebnisse der Testreihe IV (Übersicht)

Testtiere	: L _s	Substanz	: KEM [+]
Anordnung	: Typ A	Substanz	: KEMVW [-]
Zahl der Tests	: 12	[+] ¹⁾	: 117 L _s (80.3±2.2%)
[E]	: 325 L _s	[-] ¹⁾	: 29 L _s (19.7±2.2%)
Aktivität ¹⁾	: 44.9±2.2%	PW ¹⁾	: + 60.6±4.3% ***

¹⁾ : Prozent-Angaben : Mittelwert ± Standardfehler (n=12)

*** : P < 0.001 (χ^2 -Test)

Wiederum zeigten die Tiere eine signifikante Präferenz für das Kichererbsenmehl (117 L_s gegenüber 29, PW = +61%).

Zusammenfassung der Testreihen I bis IV

Die Ergebnisse der Testreihen I bis IV zeigen, daß die Gesamtfraction der flüchtigen Verbindungen aus gemahlenden *C. arietinum*-Samen auf *H. armigera*-L_s, die auf einer Kichererbsen-Diät gezogen wurden, stark attraktiv wirkt. Dieser anziehende Effekt beruht nicht auf dem Wassergehalt des Kichererbsenmehls.

3.3 Attraktivität des an Tenax adsorbierten Gesamtaromas gemahlener Kichererbsen-Samen

Nachdem die Standardtechniken zur Adsorption flüchtiger Stoffe aus gemahlenden *C. arietinum* - Samen an Tenax TA (s.III.3.2) und zur GC-Analytik derartiger Tenax-Adsorptionsröhrchen (s.III.3.4.2) entwickelt worden waren, sollte überprüft werden, ob auch das an Tenax adsorbierte Kichererbsen-Gesamtaroma T(KEM) für *H. armigera*-L_s attraktiv war.

Testreihe V : T(KEM) - T(LEER)

In der Dreizack-Anordnung (Typ B, s.III.2.3.2) wurden die flüchtigen Stoffe vom Tenax bei 38° C und einem Strom von 13 ml synthetischer Luft / min desorbiert; der zeitliche Verlauf und der Umfang der Desorption unter diesen Bedingungen wurde durch GC-Analysen untersucht (s.8.1). Als Kontrolle dienten in diesen Biotests unbeladene, frisch ausgeheizte Tenaxröhrchen T(LEER); die Testdauer betrug 40 Minuten.

Die Ergebnisse von 16 derartigen Tests (Testreihe V: T(KEM)-T(LEER)) zeigt Tab. 16; wiederum ergab sich eine hoch signifikante Präferenz der L_s für das *C. arietinum* - Gesamtaroma (111 Tiere gegenüber 25 Tieren, PW = +63%).

Tab. 16: Ergebnisse der Testreihe V (Übersicht)

Testtiere	: L _s	Substanz	: T(KEM) [+]
Anordnung	: Typ B	Substanz	: T(LEER) [-]
Zahl der Tests	: 16	[+] ¹⁾	: 111 L _s (81.6±2.5%)
[Σ]	: 320 L _s	[-] ¹⁾	: 25 L _s (18.4±2.5%)
Aktivität ¹⁾	: 42.9±1.9%	PW ¹⁾	: + 63.3±5.1% ***

¹⁾ : Prozent-Angaben : Mittelwert ± Standardfehler (n=16)

*** : P < 0.001 (χ^2 -Test)

Zusammenfassung

Tab. 17 und Abb. 29 fassen die Resultate der Testreihen I bis V zusammen.

Verteilung der
aktiven Tiere [%]

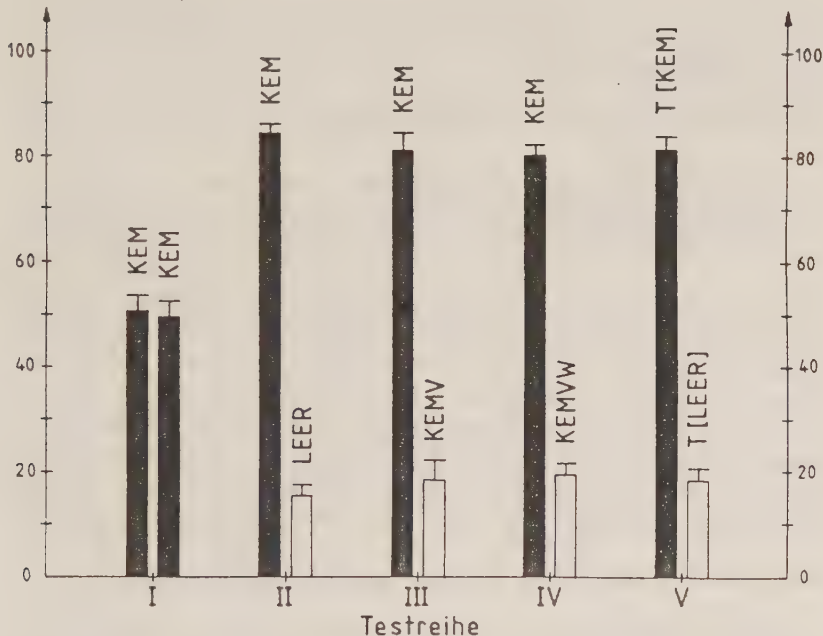


Abb. 29: Ergebnisse der Testreihen I bis V (Näheres s. Text)

Tab. 17: Zusammenfassung der Testreihen I bis V: Larventests mit der Dreizack-Anordnung und L_5 (*Cicer*-Diät)

Test-reihe	Testsubstanz		Aktive Tiere (%)		PW (%)	Signifikanz
	[+]	[-]	[+]	[-]		
I	KEM	KEM	50.6	49.4	+ 1.2	n.s.
II	KEM	LEER	84.3	15.7	+ 68.5	***
III	KEM	KEMV	81.3	18.7	+ 62.5	***
IV	KEM	KEMVW	80.3	19.7	+ 60.6	***
V	T(KEM)	T(LEER)	81.6	18.4	+ 63.3	***

Die Prozent-Angaben sind Mittelwerte aus den Einzeltest-Ergebnissen

Diese Ergebnisse belegen :

- die Funktionsfähigkeit der Dreizack-Anordnung (statistische Gleichverteilung der Tiere im Blindtest, reproduzierbare, signifikante Präferenz in Tests mit Kichererbsen-Gesamtaroma)
- die Eignung der gewählten Adsorptions- / Desorptionsmethode mit Tenax TA für den Larventest
- die Attraktivität des Gesamtaromas der flüchtigen Stoffe aus gemahlenden Kichererbsen-Samen, auch nach der Adsorption an Tenax TA, für auf Kichererbsen gezogene *H. armigera*- L_5 .

3.4 Versuche mit nicht auf Kichererbsen geprägten Larven

Während in den bisherigen Testreihen bewußt mit auf einer Kichererbsen-Diät gezogenen L_5 gearbeitet worden war, sollte nunmehr überprüft werden, ob das *C. arietinum* - Gesamtaroma auch für solche Larven attraktiv war, die vorher keinen Kontakt mit Kichererbsen gehabt hatten (zur Diskussion der Prägungseffekte s.V.2). Hierfür kamen einerseits L_5 in Frage, die mit einer anderen Diät ernährt worden waren, und andererseits frisch geschlüpfte L_1 , die noch keinerlei Nahrung aufgenommen hatten (s.III.1.2).

Testreihe VI : Tests mit L_5 des "Luzerne/Soja-Stamms"

Getestet wurde wiederum T(KEM) gegen T(LEER) unter den gleichen Bedingungen wie in Testreihe V (s.o.); als Testtiere dienten jedoch L_5 des "Luzerne/Soja-Stamms" (s.III.1.1.3).

Tab. 18: Ergebnisse der Testreihe VI (Übersicht)

Testtiere	: L ₅ ²⁾	Substanz	: T(KEM) [+]
Anordnung	: Typ B	Substanz	: T(LEER) [-]
Zahl der Tests	: 12	[+] ¹⁾	: 77 L ₅ (75.0±1.9%)
[Σ]	: 236 L ₅	[-] ¹⁾	: 26 L ₅ (25.0±1.9%)
Aktivität ¹⁾	: 43.6±2.6%	PW ¹⁾	: + 50.0±3.9% ***

¹⁾ : Prozent-Angaben : Mittelwert ± Standardfehler (n=12)

²⁾ : "Luzerne/Soja-Stamm"

*** : P < 0.001 (χ^2 -Test)

Mit den dabei erhaltenen Ergebnissen (12 Tests, Tab. 18) konnte auch bei diesen Tieren eine signifikante Präferenz für das *C. arietinum*-Gesamtaroma nachgewiesen werden, wenngleich der Präferenzwert mit +50.0% etwas niedriger lag als für die L₅ der normalen Zucht in Testreihe V (PW = +63.3%).

Testreihe VII : Blindtests mit L₁

In den Tests mit den sehr kleinen L₁ (Gewicht: < 0.1 mg pro L₁) war eine Reduzierung der Luftströmung, insbesondere im mittleren Schenkel, erforderlich. Als akzeptable Bedingungen erwiesen sich je 11 ml/min in den beiden seitlichen Armen des Dreizacks und 25 ml/min für den mittleren Luftstrom.

Vor der Durchführung der eigentlichen Tests mit L₁ erschien es als notwendig, diese Strömungsverhältnisse im Dreizack und die Verteilung der L₁ in einem Blindtest kritisch zu überprüfen.

Die neuen Strömungsverhältnisse im Dreizack wurden mit der üblichen NH₄Cl-Methode (s.o.) untersucht; es ergab sich folgendes Bild (Abb. 30):

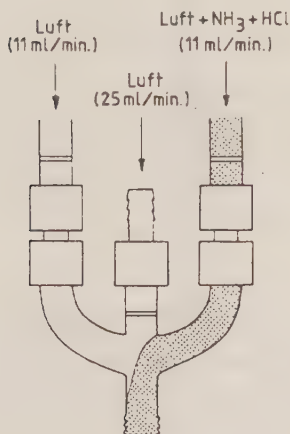


Abb. 30: Strömungsverhältnisse in der Dreizack - Anordnung für Tests mit L₁

Der beladene Luftstrom breitete sich zwar im Verzweigungsbereich des Dreizacks weiter aus als unter den Strömungsverhältnissen für L_5 -Tests (li./Mitte/re. = 15/170/15 ml/min, vgl.3.1), jedoch war nach wie vor eine klare Trennung zwischen den beiden seitlichen Luftströmen gegeben; die Gefahr einer Ausbreitung des beladenen Luftstroms bis in den gegenüberliegenden Arm des Dreizacks (wie im Y-Olfaktometer, s.2.3) bestand somit nicht.

Als nächster Schritt wurden 8 Blindtests mit L_1 und unbeladenen, frisch ausgeheizten Tenaxröhrchen auf der Substanz- und Kontrollseite durchgeführt (Testreihe VII: T(LEER)-T(LEER), Tab. 19). Dabei zeigte sich eine statistische Gleichverteilung der Tiere (71 bzw. 69 L_1 auf den beiden Seiten, PW = li. 1.2%).

Tab. 19: Ergebnisse der Testreihe VII (Übersicht)

Testtiere	: L_1	Substanz	: T(LEER) [li]
Anordnung	: Typ B	Substanz	: T(LEER) [re]
Zahl der Tests	: 8	[li] $\pm$	: 71 L_1 (50.6 $\pm$ 3.0%)
[Σ]	: 240 L_1	[re] $\pm$	: 69 L_1 (49.4 $\pm$ 3.0%)
Aktivität $\pm$)	: 58.3 $\pm$ 2.0%	PW $\pm$	: li 1.2 $\pm$ 6.1% n.s.

$\pm$) : Prozent-Angaben : Mittelwert $\pm$ Standardfehler (n=8)
n.s.: nicht signifikant (χ^2 -Test)

Testreihe VIII : T(KEM) - T(LEER) mit L_1

Wurde den frisch geschlüpften L_1 auf der einen Seite ein mit *C. arietinum* - Gesamtaroma beladenes Tenaxröhrchen, auf der anderen Seite ein unbeladenes angeboten, zeigten auch die L_1 eine hoch signifikante Bevorzugung des Kichererbsenaromas. Eine Übersicht über die Ergebnisse der 10 Tests dieser Reihe findet sich in Tab. 20.

Tab. 20: Ergebnisse der Testreihe VIII (Übersicht)

Testtiere	: L_1	Substanz	: T(KEM) [+]
Anordnung	: Typ B	Substanz	: T(LEER) [-]
Zahl der Tests	: 10	[+] $\pm$	: 159 L_1 (76.0 $\pm$ 2.9%)
[Σ]	: 295 L_1	[-] $\pm$	: 55 L_1 (24.0 $\pm$ 2.9%)
Aktivität $\pm$)	: 71.9 $\pm$ 4.1%	PW $\pm$	: + 52.0 $\pm$ 5.9% ***

$\pm$) : Prozent-Angaben : Mittelwert $\pm$ Standardfehler (n=10)
*** : $P < 0.001$ (χ^2 -Test)

Wie schon in Testreihe VI (L_5 des "Luzerne/Soja-Stamms") lag der Präferenzwert mit +52.0% wiederum etwas unter dem entsprechenden Wert für die L_5 aus der normalen Zucht (Kichererbsen-Diät).

Zusammenfassung

Die Testreihen VI bis VIII lieferten folgende Ergebnisse:

- die Dreizack-Anordnung ist unter veränderten Strömungsverhältnissen auch für Tests mit L₁ geeignet (statistische Gleichverteilung in Blindtests, reproduzierbare Präferenz für das Kichererbsenaroma)
- die an Tenax TA adsorbierten flüchtigen Stoffe aus gemahlenen *C. arietinum* - Samen weisen eine signifikante Attraktivität auch für solche *H. armigera* - Larven auf, bei denen eine Prägung auf Kichererbsen ausgeschlossen wurde.

Tab. 21 und Abb. 31 stellen nochmals die Resultate der Testreihen T(KEM) - T(LEER) mit möglicherweise geprägten und sicher nicht geprägten Tieren gegenüber.

Verteilung der
aktiven Tiere [%]

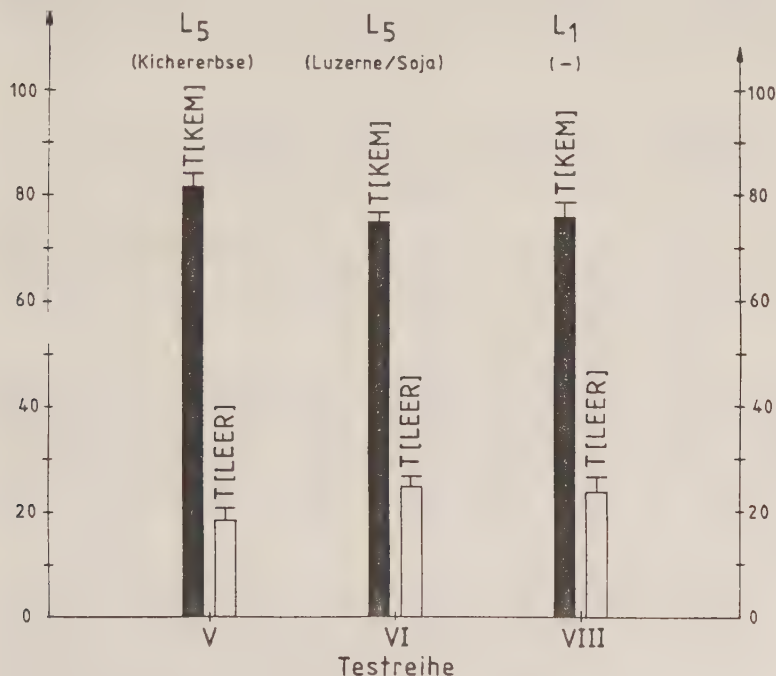


Abb. 31: Ergebnisse der Testreihen V, VI und VIII
(Erläuterungen s. Text)

Tab. 21: Zusammenfassung der Testreihen V, VI und VIII :
Larventests mit der Dreizack-Anordnung und verschiedenen Testtieren
Testsubstanzen immer : T(KEM) - T(LEER)

Testreihe	Testtiere / Diät	Aktive Tiere (%) T(KEM)	T(LEER)	PW (%)	Signifikanz
V	L ₂ /Kichererbse	81.6	18.4	+ 63.3	***
VI	L ₂ /Luzerne, Soja	75.0	25.0	+ 50.0	***
VIII	L ₁ /-----	76.0	24.0	+ 52.0	***

Die Prozent-Angaben sind Mittelwerte aus 16, 12 bzw. 10 Tests

3.5 Larventests mit synthetischen Stoffen

Vorgehen

Ausgehend von Tenax-Adsorptionsröhrchen, die wie für den Larventest mit Kichererbsen-Gesamtaroma beladen worden waren (s. III.3.2), wurden durch thermische Desorption und GC/MS-Analyse sowie durch Co-Chromatographie (s. Kapitel 6) insgesamt 154 flüchtige Stoffe aus gemahlenen *C. arietinum*-Samen identifiziert (vgl. Tab. 26, S. 78).

Nachdem die Attraktivität des an Tenax adsorbierten Gesamtaromas für *H. armigera*-Larven nachgewiesen worden war, sollte nunmehr die Reaktion der Tiere auf ausgewählte Einzelkomponenten untersucht werden.

Hierfür wurden L₁ gewählt, um eventuelle Prägungseffekte auszuschließen und weil die Tests, verglichen mit den L₂-Tests, wesentlich weniger Zeit erforderten (größere Zahl von Individuen pro Test, höhere Aktivität). Zum Vergleich von L₁ und L₂ als Testtiere s. auch V.1.2.

Aus zeitlichen Gründen konnte nur eine begrenzte Auswahl der identifizierten Verbindungen getestet werden. Prinzipiell erschienen hierfür solche Stoffe sinnvoll, bei denen unter Testbedingungen eine nennenswerte Desorption stattfand (s. 8.1); Komponenten mit einer Retentionszeit von mehr als 68 min in der üblichen GC-Analyse (vgl. Abb. 45) wurden daher nicht getestet. Unter den verbleibenden Verbindungen wurden folgende 16 ausgewählt :

- 11 Stoffe, die in relativ großer Menge im *C. arietinum*-Gesamtaroma enthalten waren und von denen aus der Literatur (vgl. V.6) eine potentielle biologische Aktivität bekannt war : 8 Terpenoide (α -Pinen, β -Pinen, Myrcen, Δ -3-Caren, Camphen, Limonen, γ -Terpinen, p-Cymol) und 3 Alkohole (Butan-1-ol, Pentan-1-ol, Hexan-1-ol).
- 4 in erheblichen Mengen enthaltene Stoffe mit - für den

Menschen - charakteristischem Geruch (Benzaldehyd, 1-Octen-3-on, 1-Octen-3-ol, 2-trans-Heptenal).

- n-Octan als Vertreter der großen Zahl von Alkanen

Diese 16 für den Larventest ausgewählten Reinstoffe repräsentierten im Kichererbsen-Aromagramm 45.4% der Gesamt-peakfläche.

Die zu testenden Referenzsubstanzen (s.III.1.4.1) wurden aus dem Headspace an Tenax TA adsorbiert (s.III.3.3). Bei jeder Probenahme für den Biotest erfolgte eine zusätzliche Adsorption an ein Tenax-Kontrollröhrchen zur Überprüfung der adsorbierten Stoffmenge mittels GC. Setzte man die durch eine Standardprobenahme aus gemahlenen *C. arietinum* - Samen erfaßte Menge der betreffenden Komponente (vgl. Tab. 30) gleich 100%, so wurde für den Biotest dieses Reinstoffes ein entsprechender Bereich von 75% bis 250% als akzeptabel angesehen.

Auf der Kontrollseite fanden in allen Tests unbeladene, ausgeheizte Tenaxröhrchen Verwendung. Für jeden Reinstoff wurden 4 bis 8 Tests durchgeführt; Testdauer (40 min) und Desorptionsbedingungen (38° C, 11 ml synthetische Luft/min) blieben gegenüber den Tests mit T(KEM) (s.o.) unverändert.

Testreihen IX bis XXIV : Tests mit 16 Reinstoffen

Tab. 22: Ergebnisse der Testreihen IX bis XXIV : Larventests mit L₁ in der Dreizack-Anordnung für 16 Reinstoffe (Erläuterungen s. Text)

Testreihe	Testsubstanz [+]-Seite	n ¹⁾	Anzahl der L ₁ [Σ] [+]	PW (%) ²⁾	Sig. ³⁾
IX	Pentan-1-ol	8	240 97	68	+17.8 *
X	(+)-Δ-3-Caren	8	240 77	56	+15.6 n.s.
XI	Myrcen	8	240 92	72	+13.2 n.s.
XII	D,L-α-Pinen	8	240 77	65	+ 9.5 n.s.
XIII	Hexan-1-ol	8	240 71	63	+ 5.5 n.s.
XIV	γ-Terpinen	4	120 44	39	+ 5.4 n.s.
XV	p-Cymol	8	240 86	79	+ 4.4 n.s.
XVI	1-Octen-3-on	4	120 41	37	+ 3.4 n.s.
XVII	D,L-Camphen	4	120 45	43	+ 1.5 n.s.
XVIII	D,L-β-Pinen	4	120 29	29	± 0.0 n.s.
XIX	D,L-1-Octen-3-ol	6	180 56	58	- 1.9 n.s.
XX	Butan-1-ol	6	180 54	57	- 2.3 n.s.
XXI	n-Octan	6	180 54	59	- 4.3 n.s.
XXII	Benzaldehyd	4	120 41	46	- 6.4 n.s.
XXIII	(+)-Limonen	8	240 70	82	- 8.4 n.s.
XXIV	2-trans-Heptenal	6	180 44	73	-22.9 **

¹⁾ n = Anzahl der Tests

²⁾ Mittelwert aus n Tests

³⁾ Signifikanz im χ^2 -Test; * : P < 0.05; **: P < 0.01;
n.s.: nicht signifikant

Tab. 22 faßt die Ergebnisse der insgesamt 100 Tests mit den o.g. 16 Komponenten des *C. arietinum*-Gesamtaromas zusammen.

Nur in 2 Fällen zeigten die Larven eine statistisch signifikante Reaktion auf die angebotene Substanz : 2-trans-Heptenal erwies sich als stark abstoßend (PW = -22.9%), Pentan-1-ol als sehr attraktiv (PW = +17.8%). Alle anderen getesteten Komponenten lagen mit ihren Präferenzwerten zwischen diesen beiden Extremen. Insgesamt ergaben sich für 9 Verbindungen positive und für 6 Stoffe negative Präferenzwerte, während die Tiere auf eine Substanz (β -Pinen) neutral reagierten.

Die Aktivität der Larven lag mit einer Ausnahme (β -Pinen: 48.3%) zwischen 55% und 73%; die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse war zufriedenstellend (Standardfehler der Präferenzwerte: 3.6% bis 10.6%).

Testreihe XXV : Gemisch aus drei Terpenen

Wie bereits erwähnt, konnte von den 16 getesteten Verbindungen nur für das Pentan-1-ol eine signifikante Attraktivität nachgewiesen werden. Die nach dem Pentan-1-ol attraktivsten Komponenten (Δ -3-Caren, Myrcen und α -Pinen) erzielten jedoch ebenfalls relativ hohe Präferenzwerte (+15.6%, +13.2% und +9.5%).

In einer weiteren Testreihe sollte daher überprüft werden, wie die L_1 auf ein an Tenax adsorbiertes Gemisch dieser 3 Terpene reagierten. Zu diesem Zweck wurde eine Mischung der 3 Flüssigkeiten in der Art und Weise hergestellt, daß bei der Adsorption aus dem Headspace unter geeigneten Bedingungen das Verhältnis der Terpene zueinander dem im Kichererbsen-Gesamtaroma entsprach und die Absolutmengen für jeden der 3 Stoffe in dem oben angegebenen Toleranzbereich lagen (75-250% der bei der Standardadsorption aus KEM erhaltenen Menge).

Alle Probenahmen wurden wiederum durch GC-Analysen kontrolliert, die die gute Reproduzierbarkeit des Verfahrens auch für das Terpengemisch belegten (s.8.2).

In den 8 Tests der Testreihe XXV dienten erneut unbeladene, ausgeheizte Tenaxröhrchen T(LEER) als Kontrolle gegenüber den mit den 3 Terpenen beladenen Tenaxröhrchen T(TERP) auf der Substanzseite; die Testdauer und die Desorptionsbedingungen blieben unverändert.

Das Ergebnis dieser Testreihe (Tab. 23) belegt eine signifikante Attraktivität des Gemisches aus Δ -3-Caren, Myrcen und α -Pinen für die L_1 . Der Präferenzwert lag mit +24.2% deutlich höher als für die attraktivste Einzelkomponente des Terpengemisches (Δ -3-Caren: PW = +15.6%).

 Tab. 23: Ergebnisse der Testreihe XXV (Übersicht)

Testtiere	: L ₁	Substanz	: T(TERP) [+]
Anordnung	: Typ B	Substanz	: T(LEER) [-]
Zahl der Tests	: 8	[+] ¹⁾	: 91 L ₁ (62.1±2.9%)
[Σ]	: 240 L ₁	[-] ¹⁾	: 56 L ₁ (37.9±2.9%)
Aktivität ¹⁾	: 61.3±1.5%	PW ¹⁾	: + 24.2±5.8% **

T(TERP): Tenax, beladen mit Terpengemisch (s. Text)

¹⁾ : %-Angaben : Mittelwert ± Standardfehler (n=8)

** : P < 0.01 (χ²-Test)

Testreihe XXVI : Terpengemisch + Pentan-1-ol

Bisher wurde somit in 2 Testreihen eine signifikante Attraktivität synthetischer Stoffe für *H. armigera*-L₁ nachgewiesen : in Testreihe IX mit Pentan-1-ol und in Testreihe XXV mit einem Gemisch aus Δ-3-Caren, Myrcen und α-Pinen. In einer abschließenden Testreihe sollte nunmehr geklärt werden, ob die Kombination der 3 Terpene mit Pentan-1-ol nochmals zu einer Erhöhung der Attraktivität führte.

Es wurde eine Mischung aus den 4 o.g. Verbindungen in der Weise hergestellt, daß nach der Headspace-Adsorption die 4 Stoffe auf dem Tenax-Röhrchen sowohl von ihrem Mengenverhältnis zueinander als auch von den Absolutmengen her den im *C. arietinum* - Gesamtaroma gefundenen Verhältnissen entsprachen (Toleranzbereich s.o.).

Die Testbedingungen (Desorption, Testdauer, Kontrollröhrchen usw.) wurden gegenüber den vorangegangenen Tests nicht verändert.

 Tab. 24: Ergebnisse der Testreihe XXVI (Übersicht)

Testtiere	: L ₁	Substanz	: T(TERP+P) [+]
Anordnung	: Typ B	Substanz	: T(LEER) [-]
Zahl der Tests	: 8	[+] ¹⁾	: 105 L ₁ (66.8±1.5%)
[Σ]	: 240 L ₁	[-] ¹⁾	: 52 L ₁ (33.2±1.5%)
Aktivität ¹⁾	: 65.4±1.9%	PW ¹⁾	: + 33.7±3.1% ***

T(TERP+P): Tenax, beladen mit Terpengemisch und Pentan-1-ol

¹⁾ : %-Angaben : Mittelwert ± Standardfehler (n=8)

*** : P < 0.001 (χ²-Test)

Die *H. armigera*-L₁ zeigten in den 8 Versuchen der Testreihe XXVI (Tab. 24) eine hoch signifikante Präferenz für das Gemisch aus Pentan-1-ol, Δ-3-Caren, Myrcen und α-Pinen. Der Präferenzwert lag mit +33.7% einerseits deutlich über den entsprechenden Werten für Pentan-1-ol (+17.8%) und das Terpengemisch (+24.2%), andererseits aber auch unter dem Präferenzwert für das Kichererbsen-Gesamtaroma (+52.0%).

Tab. 25 und Abb. 32 fassen die wichtigsten Ergebnisse der Tests mit L₁ noch einmal zusammen.

Verteilung der
aktiven Tiere [%]

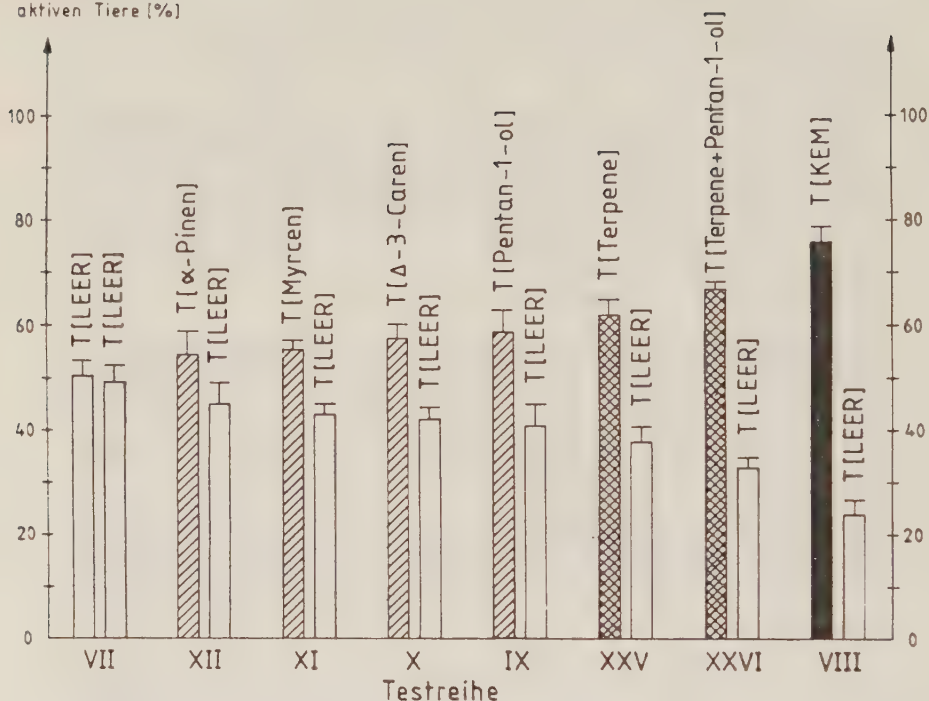


Abb. 32: Ergebnisse wichtiger Testreihen mit L₁
(Erläuterungen s. Text)

Tab. 25: Zusammenfassung wichtiger Tests mit L₁ in der
Dreizack-Anordnung (Typ B); [-]-Seite: T(LEER)

Test- reihe	[+]-Seite Tenax beladen mit	Aktive Tiere (%)		PW (%)	Signi- fikanz
		[+]	[-]		
VII	LEER	50.6	49.4	+ 1.2	n.s.
XII	α-Pinen (1)	54.8	45.2	+ 9.5	n.s.
XI	Myrcen (2)	56.6	43.4	+ 13.2	n.s.
X	Δ-3-Caren (3)	57.8	42.2	+ 15.6	n.s.
IX	Pentan-1-ol (4)	58.9	41.1	+ 17.8	*
XXV	TERP (1+2+3)	62.1	37.9	+ 24.2	**
XXVI	TERP+P (1+2+3+4)	66.8	33.2	+ 33.7	***
VIII	KEM	76.0	24.0	+ 52.0	***

Die Prozent-Angaben sind Mittelwerte, berechnet aus den Einzeltest-Ergebnissen.

B. Chemischer Teil

4. Vorversuche zum Probenahmeverfahren

4.1 Soxhlet-Extraktion, HPLC-Fraktionierung

Um mit Hilfe einer relativ einfachen Technik zu einer größeren Extraktmenge für die Untersuchung im Glastunnel-Larventest zu gelangen, wurde eine Soxhlet-Extraktion von *Cicer arietinum*-Samen mit anschließender HPLC-Fraktionierung durchgeführt (s.III.3.1.1). Die Extrakte zeigten im Test unterschiedliche biologische Aktivitäten; die Ergebnisse waren jedoch auf Grund der gelben Eigenfarbe der Extrakte nicht interpretierbar (vgl.2.1). Da zudem die angesprochene Methode vom analytischen Standpunkt aus als recht grob erschien (Extraktion großer Mengen lipophiler, nichtflüchtiger Stoffe; thermische Belastung des Materials über längere Zeit beim Extrahieren und Einengen), wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

4.2 Perforation

Der nach III.3.1.2 gewonnene Perforations-Extrakt wurde am GC/MS-System (s.III.3.5) untersucht; dabei wurde 1 µl des Extrakts (Split: 1:13) injiziert, der Ofen 5 min isotherm auf 60° C gehalten und danach mit 2°/min auf 250° C programmiert. Bei einer Ausgangsmenge von 1.0 kg *C. arietinum*-Samen und einer Extraktmenge von 1.0 ml entsprach die injizierte Menge (1.0 µl) unter Berücksichtigung des Split-Verhältnisses etwa 77 mg Kichererbsenmehl.

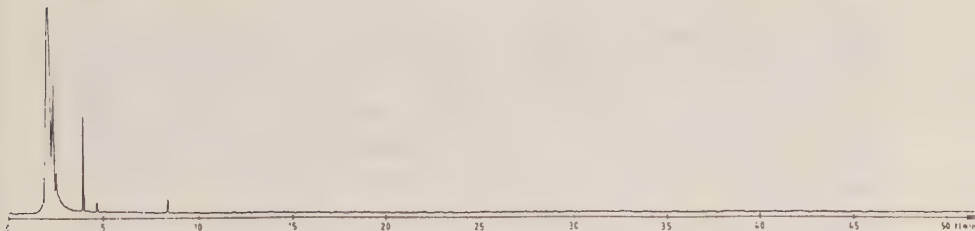


Abb. 33: Gaschromatogramm des Perforations-Extraktes, gemessen als Totalionenstrom am GC/MS-System (Erläuterungen s. Text)

Das resultierende Chromatogramm, gemessen als Totalionenstrom, zeigt Abb. 33. Bis auf einige Spuren enthielt der Extrakt keine nachweisbaren Substanzmengen. Dieses Ergebnis war reproduzierbar.

4.3 Headspace-Adsorption, Flüssigdesorption

Der durch Headspace - Adsorption an Porapak Q und anschließende Flüssigdesorption mit Ether (s.III.3.1.3) gewonnene Extrakt wurde unter den gleichen Bedingungen wie der Perforations-Extrakt am GC/MS-System untersucht. Erneut waren, von einem größeren Peak abgesehen, nur Spuren von Substanz zu erkennen.

Der unter III.3.4.3 beschriebene Doppelofen-GC erlaubte es, eine größere Extraktmenge (10 µl) nahezu splitlos auf die gepackte Säule zu injizieren, die von dieser Säule nach dem Lösungsmittelpeak eluierten Substanzen in das Totaltransferstück zu überführen und anschließend über die Kapillarsäule aufzutrennen (Abb. 34).

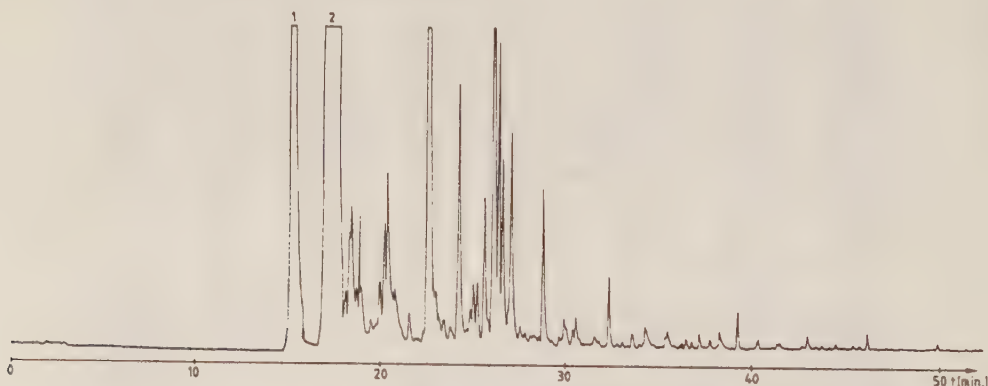


Abb. 34: Gaschromatogramm des Aromas gemahlener *Cicer arietinum*-Samen. Aufbereitung: Headspace-Adsorption an Porapak Q, Flüssigdesorption mit Ether (s. Text)

Peak 1 (Abb. 34) rührte von den Substanzen her, die nach dem Aufheizen des Totaltransferstücks an der Kapillartrennsäule vorbei über eine Bypass-Kapillare zum Detektor gelangten (3% der Gesamtpeakfläche). Obwohl der überwiegende Teil des Lösungsmittels über die gepackte Säule abgetrennt worden war, machte der Lösungsmittelpeak im Kapillarchromatogramm (Peak 2) immer noch 92% der Gesamtpeakfläche aus. Nur 5% der Peakfläche entfielen somit auf die interessierenden Verbindungen.

Dennoch konnten auf Grund des Anreicherungsfaktors von etwa 100 gegenüber der im GC/MS-System eingesetzten Menge (1 µl, Split 1:13) zahlreiche Substanzen detektiert werden (s. Abb. 34). Bei einer Ausgangsmenge von 5.2 kg Samenmehl und einem Extraktvolumen von 2 ml entsprach die injizierte Menge von 10 µl unter Berücksichtigung des minimalen Splits etwa 23 g *C. arietinum*-Mehl.

Große Probleme bereitete die Reinigung der Porapak-Röhrchen. Auch nach intensivem Spülen des Porapak Q mit

Diethylether und dem Ausheizen der Röhrchen an der Grenze der thermischen Belastbarkeit (250°C für Porapak Q nach Butler und Burke [66]) waren in den Porapak-Blindeluateten immer noch mehrere Verunreinigungspeaks nachweisbar.

Als Konsequenz aus diesen Vorversuchen zum Probenahmeverfahren wurde in den folgenden Experimenten

- wegen der größeren thermischen Stabilität dieses Polymers (Butler und Burke [66]) Tenax TA an Stelle von Porapak Q als Adsorptionsmaterial verwendet und
- die angereicherten Verbindungen wurden thermisch desorbiert, um den Verdünnungseffekt durch das Lösungsmittel zu eliminieren.

5. Überprüfung der gewählten analytischen Methoden : Headspace-Adsorption an Tenax / thermische Desorption / Gaschromatographie

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse einiger Versuche dargestellt, die der kritischen Überprüfung der folgenden, letztlich angewandten analytischen Verfahren dienen:

- Headspace-Adsorption an Tenax TA,
- thermische Desorption,
- gaschromatographische Untersuchung.

5.1 Funktionsfähigkeit des GC-Systems (Normalbetrieb)

Um die allgemeinen Funktionen des Gaschromatographen und den korrekten Einbau der Kapillarsäule zu überprüfen, wurden im normalen Betriebsmodus für Flüssiginjektion (III.3.4.1) einige Säulenparameter bestimmt. Die Auswahl und die Berechnung dieser Parameter erfolgten nach Schomburg [67], Jennings [68] sowie Poole und Schuette [69].

Lineare Gasgeschwindigkeit

Mit Hilfe der Methan-Injektion wurde die lineare Gasgeschwindigkeit bei einer Ofentemperatur von 60°C auf 24 cm/sec eingestellt; dies entsprach einem Fluß über die Kapillarsäule von 1.20 ml He/min.

Injektion eines Testgemisches

Zur Überprüfung der Peakform für Verbindungen stark unterschiedlicher Polarität wurde auf die gewählte Trennsäule ein Testgemisch ("Testmixture 6", Chrompack) injiziert, das je 0.1% der folgenden Komponenten, gelöst in Cyclohexan, enthielt: 1-Octanol (Peak 1 in Abb. 35), n-Undecan (2), 2,6-Dimethylphenol (3), Octansäuremethylester (4), 2,6-Dime-

thylanilin (5), Naphthalin (6), n-Dodecan (7), n-Tridecan (8) und Decansäuremethylester (9). Chromatographische Bedingungen : PTV: 270° C, Detektor: 250° C, Ofen: 140° C isotherm, Injektionsmenge: 0.18 µl, Split: 1:70. Das resultierende Chromatogramm zeigt Abb. 35.

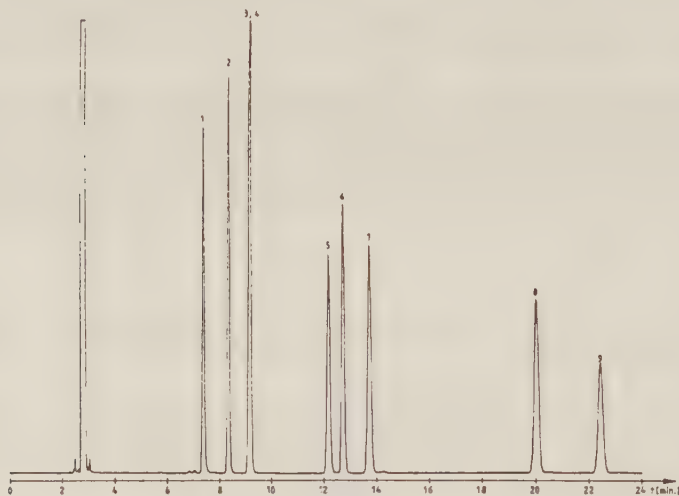


Abb. 35: Gaschromatogramm eines Testgemisches (normaler Injektionsmodus); Erläuterungen s. Text.

Das Trennmuster entsprach exakt dem vom Hersteller angegebenen; die Peaks 2 bis 9 zeigten völlig symmetrische Formen, lediglich Peak 1 (1-Octanol) wies ein schwaches Tailing auf.

Theoretische Bodenzahl

Als Maß für die Effizienz einer chromatographischen Säule dient die theoretische Trennstufenzahl N :

$$N = 5.54 \times (t_R / w_h)^2$$

wobei t_R = Gesamtretentionszeit (sec) und w_h = Breite des Peaks in halber Höhe (sec).

Mit Hilfe des o.g. Testgemisches und unter den gleichen chromatographischen Bedingungen wie oben, ergab sich für n-Tridecan eine theoretische Bodenzahl von 72000 (140° C Ofentemperatur). Gemessen an der Herstellerangabe von 75000 Böden und den in der analytischen Praxis üblichen Trennstufenzahlen von 40000 bis 100000 [67] war dieser Wert zufriedenstellend.

Höhe einer theoretischen Trennstufe

Die Höhe H eines theoretischen Bodens errechnet sich aus der Säulenlänge L und der theoretischen Bodenzahl N nach :

$$H = L / N$$

Im vorliegenden Fall ($L = 25 \text{ m}$) ergab sich: $H = 0.35 \text{ mm}$.

Kapazitätsverhältnis

Das Kapazitätsverhältnis k' ist ein Maß für die Mengenverteilung einer Verbindung zwischen stationärer und mobiler Phase :

$$k' = n_L / n_G$$

mit n_L bzw. n_G = Menge der Komponente in der stationären, flüssigen bzw. in der mobilen, gasförmigen Phase. Berechnet wird k' nach :

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$

mit t_R = Gesamtretentionszeit der Komponente und t_0 = Totzeit. Für n -Tridecan ergab sich daraus : $k' = 8.5$.

Trennzahl, Effektive Peak-Zahl

Diese beiden Kennzahlen charakterisieren die Trennleistung einer Säule und geben an, wie viele Verbindungen zwischen 2 Standardsubstanzen (2 aufeinanderfolgende Glieder einer homologen Reihe) getrennt werden können, wobei die geforderte Auflösung R für die Effektive Peak-Zahl (EPN) 1.00 beträgt, für die Trennzahl (TZ) dagegen 1.177 (Jennings [68]). Die Berechnung erfolgt nach :

$$EPN = \frac{2 (t_{R2} - t_{R1})}{(W_{b2} + W_{b1})} - 1$$

$$TZ = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(W_{h2} + W_{h1})} - 1$$

mit t_{R2} , t_{R1} = Retentionszeiten des höheren und niedrigeren Homologen und W_{b2} , W_{b1} , W_{h2} , W_{h1} = entsprechende Peakbreiten an der Basis bzw. in halber Peakhöhe.

Beide Parameter wurden mit dem obigen Testgemisch für das Paar n -Undecan/ n -Dodecan bestimmt. Chromatographische Bedingungen: Ofen: 125°C isotherm, sonst wie oben. Es ergaben sich : $EPN = 29$ und $TZ = 25$. Die Trennleistung der Säule war damit zufriedenstellend; die ermittelten Werte stimmten gut mit der theoretisch geforderten Beziehung ($EPN = 1.17 \times TZ - 0.177$) überein.

5.2 Thermische Desorption (Leerdesorption)

Nach der Umrüstung des GC-Systems auf thermische Desorption (III.3.4.2) wurde ein frisch ausgeheiztes Tenax-Adsorptionsröhrchen in den GC eingesetzt und unter normalen Analysenbedingungen (III.3.4.2) desorbiert. Das resultierende Leerchromatogramm zeigt Abb. 36 A.

Es enthielt lediglich einen nennenswerten Peak ("S"); die späteren GC/MS-Analysen ergaben, daß es sich dabei um eine Siloxanverbindung ($M^+ = 207$), vermutlich aus der Trennphase der Vor- und / oder Kapillarsäule, handelte. Dieser Peak "S" trat in allen Chromatogrammen auf. Die Summe der Peakflächen lag unter 0.2% von der eines durchschnittlichen Chromatogramms eines Kichererbsen-Gesamtaromas.

Damit war eindeutig nachgewiesen, daß

- die angewandten Bedingungen für das Ausheizen der Adsorptionsröhrchen voll ausreichten und
- weder das Tenax noch das GC-System unter den gewählten Analysenbedingungen in nennenswertem Ausmaß Störpeaks produzierten.

Im Gegensatz zu den Porapak-Röhrchen erwies sich damit die Vorreinigung des Tenax auf Grund der höheren thermischen Stabilität dieses Polymers als unproblematisch.

5.3 Blindprobenahme

Durch eine Blindprobenahme sollte untersucht werden, in welchem Ausmaß durch die Probenahme Verbindungen auf das Adsorptionsröhrchen gelangten, die nicht aus der zu untersuchenden Probe stammten. Als Verunreinigungsquellen kamen insbesondere in Betracht :

- Lösungsmittelreste von der Reinigung der Glasgeräte
- Substanzen aus der Laborluft
- Verunreinigungen aus der Probenahmeapparatur (Stickstoff, Gaszuleitungen, Dichtungen etc.).

Die Blindprobenahme wurde exakt so durchgeführt, wie für das *C. arietinum*-Mehl unter III.3.2 beschrieben (einschließlich der Vorreinigung der Geräte; Öffnen des Probenahmekolbens für die Zeitdauer, die normalerweise zum Einfüllen des Mahlguts benötigt wurde, usw.), nur mit einem leeren Probenahmekolben. Anschließend wurde das Röhrchen wie üblich desorbiert. Ein typisches, so erhaltenes Blindadsorptionschromatogramm zeigt Abb. 36 B.

Gegenüber dem Leerchromatogramm (Abb. 36 A) traten deutlich mehr Substanzen auf, jedoch alle nur in sehr geringen

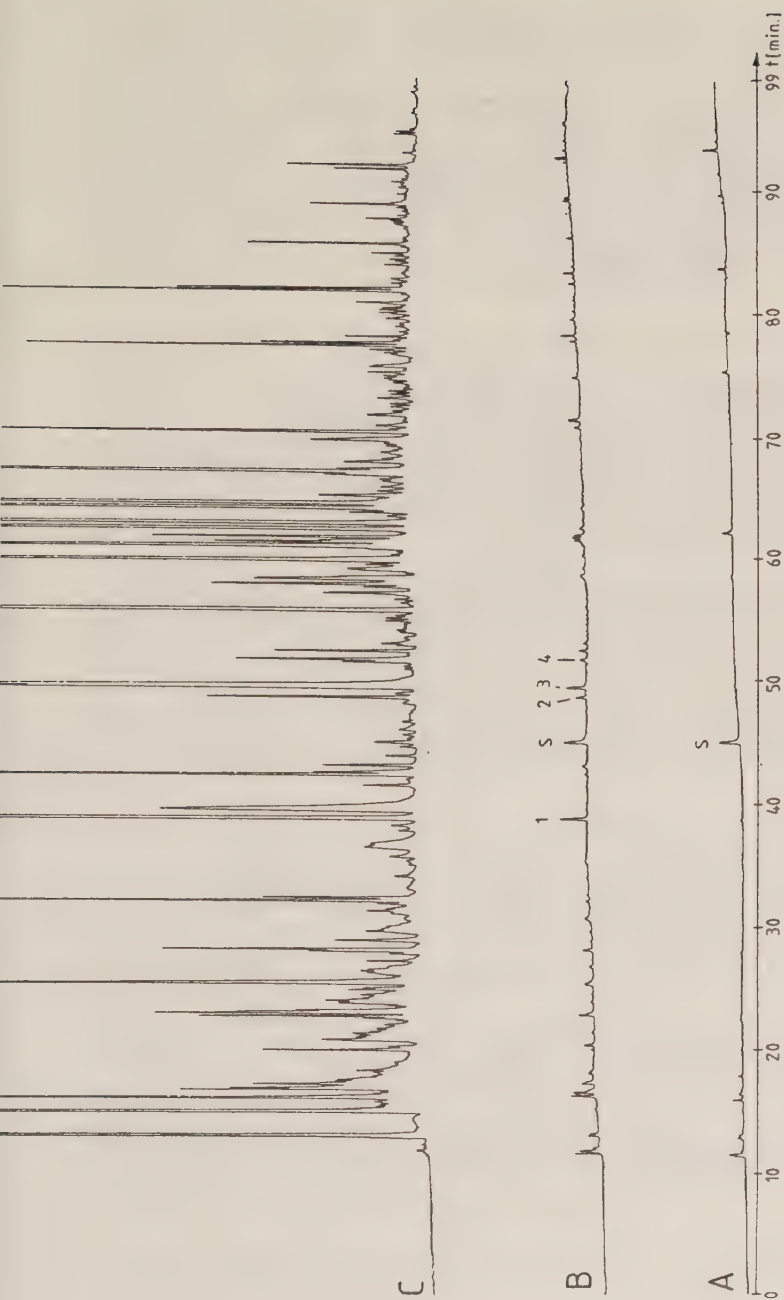


Abb. 36: Gaschromatogramme im thermischen Desorptions-Modus:

A: Leerdesorption; B: Blindprobenahme; C: Gesamt-
aroma gemahlener *C. arietinum*-Samen (s. Text).

Mengen. Die Gesamtpeakfläche betrug 0.8% von der eines durchschnittlichen Chromatogramms des *C. arietinum*-Gesamtaromas unter identischen Bedingungen.

Zwar wurde von den Blindadsorptionen kein GC/MS-Lauf aufgenommen, jedoch traten gegenüber dem Leerchromatogramm u.a. genau bei den Retentionszeiten zusätzliche Peaks auf, bei denen später im *C. arietinum* - Aroma folgende Verbindungen (allerdings in unvergleichbar größeren Mengen) identifiziert wurden: Toluol (Peak 1 in Abb. 36 B), Ethylbenzol (2), p- und m-Xylol (3) sowie o-Xylol (4). Die Größe dieser Peaks im Blindadsorptionschromatogramm lag bei 1-4% der entsprechenden Peaks im Kichererbsen-Chromatogramm.

5.4 Probenahme flüchtiger Stoffe aus *Cicer arietinum*-Samen

Die Headspace-Probenahme flüchtiger Verbindungen aus gemahlenden *C. arietinum* - Samen wurde wie unter III.3.2 beschrieben durchgeführt und das Adsorptionsröhrchen mit der normalen Analysenmethode (III.3.4.2) desorbiert; Abb. 36 C zeigt ein typisches Chromatogramm der Standardsorte käuflicher *C. arietinum*-Samen. Dabei konnten zwischen gewaschenen und ungewaschenen Samen (s.III.1.3.1) keine Unterschiede im Peak-Muster festgestellt werden.

Die Chromatogramme in Abb. 36 A-C wurden unter identischen Analysenbedingungen erhalten und erlauben somit einen direkten Größenvergleich entsprechender Peaks. Abb. 36 C belegt, daß die Kapazität der auf -150° C gekühlten Vorsäule ausreichte, um die von der Tenax-Packung desorbierten Stoffe quantitativ aufzunehmen, weil während der Kühlphase (0-10 min) keinerlei Substanzdurchbruch auftrat und auch die leichtflüchtigen Verbindungen gut fokussiert wurden.

5.5 Quantitative Adsorption

Aus der Literatur war bekannt, daß die relativ geringe Adsorptionskapazität von Tenax oft der limitierende Faktor für die Verwendung dieses Adsorbens war (vgl. dazu V.3.4). Es galt daher zu prüfen, ob die Tenax-Adsorptionsröhrchen die flüchtigen Stoffe aus den Kichererbsen mit der angewandten Technik quantitativ adsorbierten.

Dazu wurde eine Headspace-Probenahme unter den üblichen Bedingungen durchgeführt, jedoch mit 2 Adsorptionsröhrchen hintereinander (Primär- und Sekundärröhrchen, s.III.3.2.4). Für diese Analyse wurde nicht die Standardsorte, sondern eine andere Charge handelsüblicher *C. arietinum* - Samen eingesetzt. Abb. 37 zeigt die unter den üblichen Desorptionsbedingungen erhaltenen Chromatogramme von Primär- (B) und Sekundärröhrchen (C).

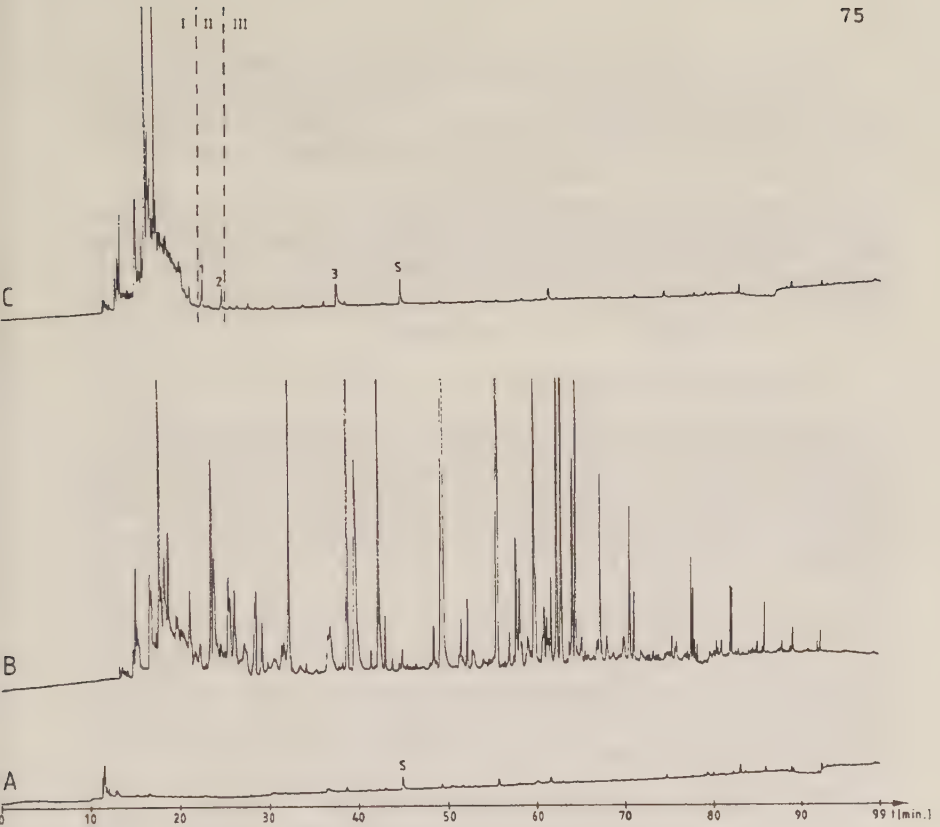


Abb. 37: Gaschromatogramme im thermischen Desorptions-Modus:
A: Nachdesorption; B: Primär-, C: Sekundärröhrchen
einer Headspace-Adsorption aus gemahlene *C. arietinum*-Samen (Erläuterungen s. Text).

Das Sekundär - Adsorptionschromatogramm (Abb. 37 C) ließ sich in 3 Bereiche einteilen :

- I Sehr leichtflüchtige Substanzen (t_R : 11-22 min, Elutionstemperatur $< 20^\circ \text{C}$) brachen bei der Probenahme in erheblichem Ausmaß durch das Primärröhrchen durch.
- II Im Bereich der leichtflüchtigen Verbindungen (t_R : 22-25 min, Elutionstemperatur: $20-26^\circ \text{C}$) brachen 2 Substanzen (Peaks 1 und 2 in Abb. 37 C) zu einem kleinen Teil auf das Sekundärröhrchen durch.
- III Verbindungen mit einer Retentionszeit von mehr als 25 min (Elutionstemperatur $> 26^\circ \text{C}$) wurden vom Primär-

röhrchen quantitativ adsorbiert. Das reproduzierbare Auftreten von Peak 3 im Sekundärchromatogramm konnte nicht erklärt werden, da bei der betreffenden Retentionszeit im Primärchromatogramm ein entsprechender Peak fehlte; abgesehen von Peak S (s.5.2) traten sonst keine weiteren nennenswerten Peaks auf.

Die beobachtete Adsorptionskapazität der Tenaxröhrchen stand damit in Einklang mit den Angaben in der Literatur (s. dazu V.3.4) und reichte für das untersuchte Problem aus. Quantitative Analysen erschienen für alle Stoffe des Bereichs III unproblematisch, aber auch für Stoffe des Bereichs II noch sinnvoll und vertretbar.

5.6 Quantitative Desorption

Um zu überprüfen, ob die gewählten Bedingungen zur thermischen Desorption der an Tenax adsorbierten flüchtigen Stoffe ausreichten (Temperatur: 150° C, Helium-Fluß: ca. 20 ml/min, Dauer: 10 min), wurde das Primäradsorptionsröhrchen des obigen Versuchs anschließend an die normale Desorption (Abb. 37B) erneut desorbiert, ohne es aus dem GC zu entfernen (Nachdesorption, Abb. 37A).

Abb. 37 A zeigt, daß auch die schwerer flüchtigen Stoffe quantitativ desorbiert worden waren; die Summe der Peakflächen betrug für die Nachdesorption 0.6% von der des Kichererbsenaromagramms. Ferner belegt Abb. 37 A, daß auch für polare Verbindungen (es wurde z.B. eine Reihe von Alkoholen identifiziert, s.u.) keine nachweisbaren Adsorptionseffekte im Injektionssystem auftraten.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß

- vom GC-System, der Tenax-Packung und der Probenahme herrührende Verunreinigungen nur in vernachlässigbar kleinen Mengen auftraten
- sowohl die Adsorption (bis auf einige sehr flüchtige Stoffe) als auch die Desorption und Überführung der flüchtigen Verbindungen auf die GC-Säule praktisch quantitativ erfolgten und
- das aus Kichererbsensamen erhaltene komplexe Stoffgemisch auf der Kapillarsäule hervorragend aufgetrennt wurde.

6. Qualitative Analyse : Identifizierung flüchtiger Stoffe aus *Cicer arietinum*-Samen

Nachdem sich die gewählte Probenahme- und Analysenmethode als geeignet erwiesen hatte und die Attraktivität des Gesamtaromas gemahlener *C. arietinum*-Samen für die Larven von *H. armigera* eindeutig nachgewiesen war (s. Kapitel 3), sollten nun möglichst viele Einzelkomponenten des Gesamtaromas identifiziert werden.

6.1 Gaschromatographie / Massenspektrometrie (GC/MS)

Für die GC/MS-Analysen wurden einige Tenax-Adsorptionsröhrchen nach der üblichen Methode (III.3.2) mit dem Gesamtaroma aus *C. arietinum*-Samen beladen. Da für die Identifizierung (qualitative Analyse) nicht unbedingt eine quantitative Adsorption notwendig war, wurden darüber hinaus einige Probenahmen mit der doppelten Menge Samenmehl (50 g) und der 2-fachen Adsorptionsdauer (30 min) durchgeführt, ohne zu überprüfen, ob dabei ein Substanzdurchbruch auftrat. Dies erleichterte die Identifizierung von Komponenten, die nur in sehr geringen Mengen vorlagen. Zur Technik der GC/MS-Analyse und zur Auswertung der erhaltenen Daten s.III.3.5.

In einem durchschnittlichen Gesamtaroma-Chromatogramm erkannte der Integrator rund 200 Peaks. Die GC/MS-Analyse und die anschließende Auswertung der Daten lieferten für diese Peaks Strukturvorschläge, basierend auf den Massenspektren. Bei 154 Verbindungen zeigten die jeweiligen Massenspektren eine sehr gute Übereinstimmung mit den entsprechenden Spektren authentischer Vergleichssubstanzen in der Spektrenbibliothek. Abb. 38 (S. 82) demonstriert dies am Beispiel des α -Pinen.

Tabelle 26 listet diese 154 Verbindungen, geordnet nach Substanzklassen, auf. Stoffe, bei denen die Identifizierung ausschließlich auf den Massenspektren basiert, sind dabei mit einem "c" in Spalte 5 gekennzeichnet (7 Substanzen).

Tabelle 26 : Auflistung der identifizierten flüchtigen Stoffe aus gemahlenden *C. arietinum*-Samen

lfd. Nr.	Peak Nr. ¹⁾	Verbindung	Kovats-index ²⁾	Id. ³⁾	Menge (%) ⁴⁾
<u>Aliphatische Alkohole</u>					
1	1/A	Ethanol	503	a	3.7
2	7/G	Propan-1-ol	574	a	0.7
3	19/S	Butan-1-ol	671	a	0.5
4	31	Pentan-1-ol	775	a	2.3
5	40	Hexan-1-ol	878	a	5.3
6	56	Heptan-1-ol	972	a	0.2
7	4/D	Propan-2-ol	524	a	2.5
8	11/K	Butan-2-ol	612	a	1.1
9	24	Pentan-2-ol	705	a	0.1
10		Hexan-2-ol	804	b	
11	44	Heptan-2-ol	904	a	0.1
12		2-Methyl-propan-2-ol	540	b	
13	14/N	2-Methyl-propan-1-ol	636	a	0.8
14	27	2-Methyl-butan-1-ol	743	a	0.4
15	26	3-Methyl-butan-1-ol	741	a	0.4
16		trans-2-Buten-1-ol	654	d	
17		trans-2-Hepten-1-ol	970	c	
18	20	1-Penten-3-ol	687	a	< 0.1
19		1-Octen-3-ol	980	b	
<u>Aliphatische Aldehyde</u>					
20	34	Hexanal	798	a	0.3
21	72	Nonanal	1101	a	0.2
22	77	Decanal	1203	a	< 0.1
23	6/F	2-Methyl-propanal	554	a	0.3
24	18/R	2-Methyl-butanal	658	a	0.3
25	16/P	3-Methyl-butanal	649	a	0.2
26	15/O	trans-2-Butenal	645	a	< 0.1
27	29	trans-2-Pentenal	751	a	< 0.1
28	36	trans-2-Hexenal	849	a	< 0.1
29	51	trans-2-Heptenal	952	a	0.7
30		2-Methyl-2-propenal	566	d	
<u>Aliphatische Ketone</u>					
31	3/C	Aceton	503	a	1.4
32	9/I	Butan-2-on	602	a	1.1
33	21	Pentan-2-on	687	a	0.1
34	32	Hexan-2-on	788	a	< 0.1
35	42	Heptan-2-on	890	a	< 0.1
36	28	2-Methyl-pentan-3-on	748	a	< 0.1
37		1-Octen-3-on	975	c	
38	66	3-Octen-2-on	1035	a	< 0.1

Tab. 26, Fortsetzung

lfd. Nr.	Peak Nr. ¹⁾	Verbindung	Kovats- index ²⁾	Id. ³⁾	Menge (%) ⁴⁾
<u>Aliphatische Ester</u>					
39	5/E	Essigsäuremethylester	531	a	< 0.1
40	12/L	Essigsäureethylester	618	a	0.1
41		Essigsäurebutylester	817	b	
42	45	γ -Butyrolacton	908	a	< 0.1
<u>Terpenoide</u>					
43		α -Thujen	923	b	
44	48	α -Pinen	928	a	12.6
45	49	Camphen	938	a	0.3
46	57	β -Pinen	968	a	3.4
47	59	Myrcen	989	a	1.3
48		α -Phellandren	997	b	
49	61	Δ -3-Caren	1004	a	6.9
50	62	α -Terpinen	1009	a	0.1
51	63	p-Cymol	1019	a	2.9
52		β -Phellandren	1021	b	
53	64	Limonen	1023	a	3.6
54	68	γ -Terpinen	1055	a	3.4
55	70	Terpinolen	1082	a	0.8
<u>n-Alkane</u>					
56	2/B	n-Pentan	500	a	1.4
57	8/H	n-Hexan	600	a	0.6
58	22	n-Heptan	700	a	1.1
59	33	n-Octan	800	a	1.6
60	43	n-Nonan	900	a	0.3
61	60	n-Decan	1000	a	0.8
62	71	n-Undecan	1100	a	1.4
63	75	n-Dodecan	1200	a	0.8
64	79	n-Tridecan	1300	a	0.4
65	80	n-Tetradecan	1400	a	0.3
66	81	n-Pentadecan	1500	a	0.1
67	82	n-Hexadecan	1600	a	< 0.1
<u>Methylverzweigte Alkane</u>					
68		2-Methyl-hexan	659	b	
69		2-Methyl-heptan	763	b	
70		2-Methyl-octan	864	b	
71	54	2-Methyl-nonan	964	a	0.1
72	69	2-Methyl-decan	1064	a	0.2
73	74	2-Methyl-undecan	1164	a	0.2
74		2-Methyl-dodecan	1264	b	
75		3-Methyl-hexan	667	b	
76		3-Methyl-heptan	770	b	
77		3-Methyl-octan	870	b	
78	55	3-Methyl-nonan	970	a	0.2
79		3-Methyl-decan	1070	b	

Tab. 26, Fortsetzung

lfd. Nr.	Peak Nr. ¹⁾	Verbindung	Kovats-index ²⁾	Id. ³⁾	Menge (%) ⁴⁾
80		3-Methyl-undecan	1171	b	
81		3-Methyl-dodecan	1271	b	
82		4-Methyl-heptan	764	b	
83		4-Methyl-octan	863	b	
84	53	4-Methyl-nonan	962	a	0.2
85		4-Methyl-decan	1060	b	
86		4-Methyl-undecan	1160	b	
87		4-Methyl-dodecan	1259	b	
88		5-Methyl-nonan	960	b	
89		5-Methyl-decan	1057	b	
90		5-Methyl-undecan	1156	b	
91		5-Methyl-dodecan	1255	b	
92		6-Methyl-undecan	1154	b	
93		6-Methyl-dodecan	1253	b	
94		2,2,4-Trimethyl-pentan	680	b	
95		2,3-Dimethyl-hexan	755	b	
96		2,4-Dimethyl-hexan	729	b	
97		2,5-Dimethyl-hexan	727	b	
98		2,4-Dimethyl-heptan	821	b	
99		?-Dimethyl-octan	933	d	
100		?-Dimethyl-decan	1117	d	
101		?-Dimethyl-decan	1127	d	
102		?-Dimethyl-undecan	1214	d	
103		?-Dimethyl-undecan	1218	d	
104		?-Dimethyl-undecan	1222	d	
105		?-Dimethyl-undecan	1228	d	
106		?-Dimethyl-undecan	1273	d	

Cycloalkane

107		Ethyl-cyclopentan	725	b	
108	25	Methyl-cyclohexan	713	a	< 0.1
109	35	Ethyl-cyclohexan	824	a	< 0.1
110	47	Propyl-cyclohexan	923	a	< 0.1
111	65	Butyl-cyclohexan	1025	a	< 0.1
112	73	Pentyl-cyclohexan	1128	a	< 0.1
113		Hexyl-cyclohexan	1234	c	
114	67	trans-Decalin	1042	a	0.3
115		2-Methyl-decalin	1115	c	

Alkene

116		1-Hexen	586	b	
117		?-Hexen	607	d	
118		?-Hexen	618	d	
119		1-Octen	790	b	
120		2-Octen	813	d	
121		4-Octen	806	d	
122		?-Octadien	824	d	

Tab. 26, Fortsetzung

lfd. Nr.	Peak Nr. ¹⁾	Verbindung	Kovats- index ²⁾	Id. ³⁾	Menge (%) ⁴⁾
<u>Aromatische Verbindungen</u>					
123	17/Q	Benzol	650	a	0.6
124	30	Toluol	758	a	7.7
125	37	Ethylbenzol	853	a	0.7
126	38	p-Xylol	861	a	0.7
127	39	m-Xylol	862	a	0.7
128		Styrol	882	b	
129	41	o-Xylol	884	a	0.5
130	46	Cumol (Isopropylbenzol)	917	a	< 0.1
131	50	Propylbenzol	946	a	0.1
132		?-Methyl-ethyl-benzol	954	d	
133		?-Methyl-ethyl-benzol	955	d	
134		?-Methyl-ethyl-benzol	971	d	
135		?-Trimethyl-benzol	961	d	
136		?-Trimethyl-benzol	984	d	
137		?-Trimethyl-benzol	1012	d	
138		3,5-Dimethyl-phenol	931	d	
139	52	Benzaldehyd	949	a	0.6
140	58	Benzonitril	973	a	< 0.1
141	76	Esdragol	1192	a	0.6
142	78	Anethol	1279	a	0.9
<u>Furane</u>					
143	10/J	2-Methyl-furan	604	a	0.3
144	23	2-Ethyl-furan	701	a	0.3
145		2-Propyl-furan	787	b	
146		2-Butyl-furan	889	b	
147		2-Pentyl-furan	989	b	
148		2-Hexyl-furan	1079	b	
<u>Sonstige</u>					
149		Dimethyldisulfid	734	b	
150	13/M	Tetrahydrofuran	621	a	1.8
151		Dichlormethan	531	c	
152		Chloroform	616	b	
153		1,2-Dichlor-ethan	641	c	
154		Trichlor-ethan	693	c	

¹⁾ Die Nummern beziehen sich auf Abb. 42, die Buchstaben auf Abb. 41 A.

²⁾ Kovats-Retentionsindices, bestimmt auf der SE-54-Kapillarsäule des GC/MS-Systems (s.III.3.5).

³⁾ Zuverlässigkeit der Identifizierung :

a : Retentionszeit und Massenspektrum von Probe und entsprechender Referenzsubstanz stimmen überein

b : Kovats-Index und Massenspektrum in Übereinstimmung mit den entsprechenden Literaturwerten

Tab. 26, Fortsetzung

- c : Massenspektrum stimmt mit Literaturspektrum überein
 d : Unvollständige Identifizierung an Hand des Massenspektrums (z.B.: exakte Position einer Methylverzweigung oder einer Doppelbindung nicht bekannt bzw. unsicher : "?")
- *) Prozentualer Anteil an der Gesamtpeakfläche (Angaben nur für die durch Co-Chromatographie identifizierten Verbindungen)
-

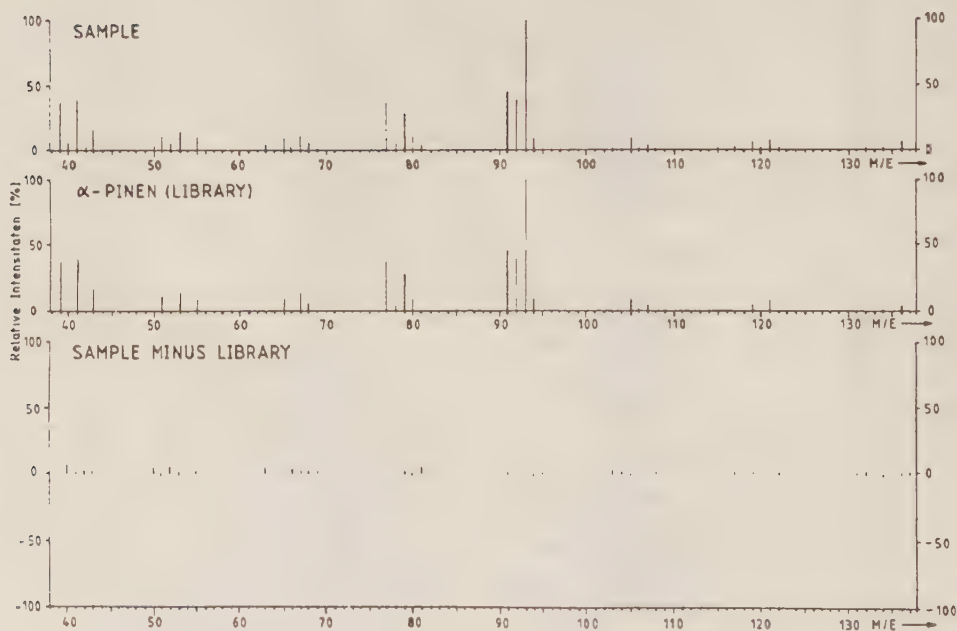


Abb. 38: Auswertung der GC/MS-Analyse :

(oben): während der GC/MS-Analyse aufgenommenes Massenspektrum einer Komponente des *C. arietinum*-Gesamtaromas (Peak 48 in Abb. 42)
 (Mitte): am gleichen Gerät aufgenommenes Massenspektrum von α -Pinen (Vergleich)
 (unten): Differenzspektrum "Probe minus Vergleich"

6.2 Co-Chromatographie

Soweit für die 154 nach ihren Massenspektren identifizierten Stoffe authentische Referenzsubstanzen zur Verfügung standen, wurde die MS-Identifizierung durch einen Vergleich der Retentionszeiten abgesichert.

Dazu wurde zunächst eine Headspace-Probenahme einer einzelnen Referenzsubstanz durchgeführt (s.III.3.3) und mit der üblichen Analysenmethode deren Retentionszeit bestimmt. Abb. 39 A zeigt ein derartiges Chromatogramm für α -Pinen. Eine solche Analyse konnte auch für mehrere Glieder einer homologen Reihe gleichzeitig erfolgen; Abb. 39 B zeigt dies für die n-Alkane von n-Pentan bis n-Hexadecan. In wenigen Fällen, vor allem bei einzelnen, sehr großen Peaks wie α -Pinen, genügte bereits dieser Vergleich der Retentionszeiten zur Absicherung der MS-Identifizierung.

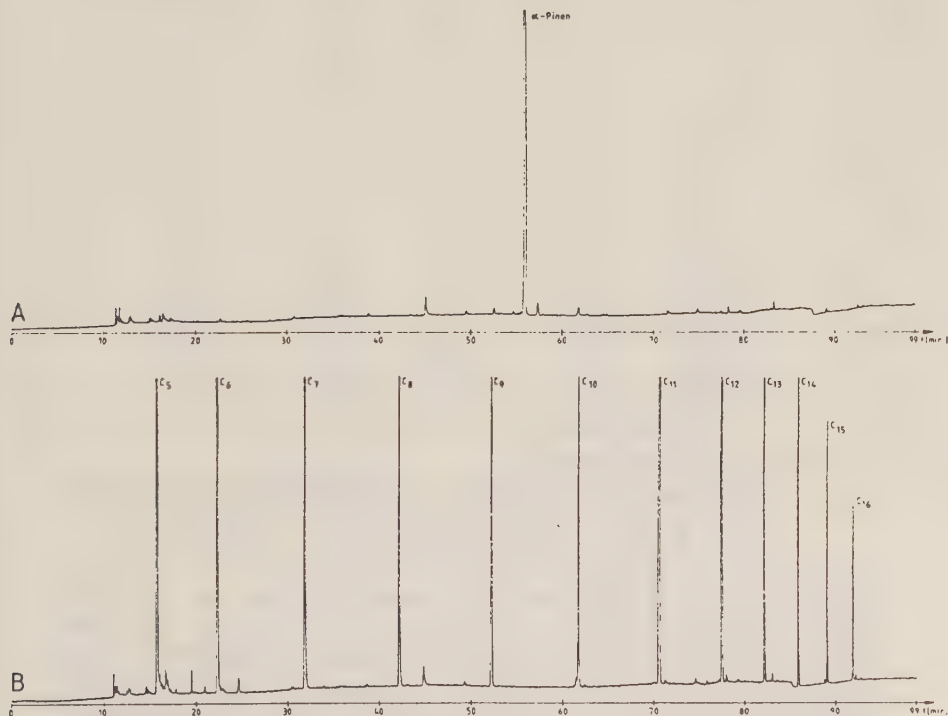


Abb. 39: Gaschromatogramme synthetischer Vergleichssubstanzen nach Headspace-Adsorption und thermischer Desorption. A: α -Pinen; B: Gemisch von n-Alkanen.

In nahezu allen Fällen bedurfte es jedoch darüber hinaus einer co-chromatographischen Analyse. Dazu wurde nach einer Standard-Adsorption des Gesamtaromas aus *C. arietinum*-Samen (s.III.3.2) zusätzlich an das gleiche Tenax-Röhrchen noch Headspace einer (oder mehrerer) Referenzsubstanz(en) adsorbiert. Durch eine Erhöhung des (bzw. der) entsprechenden Peaks im Gesamtchromatogramm war so eine eindeutige Zuordnung auch für sehr nahe beieinander liegende Peaks möglich. Abb. 40 belegt dies für die Peak-Gruppe aus Propylbenzol, 2-trans-Heptenal, Benzaldehyd und 2-Methyl-nonan.

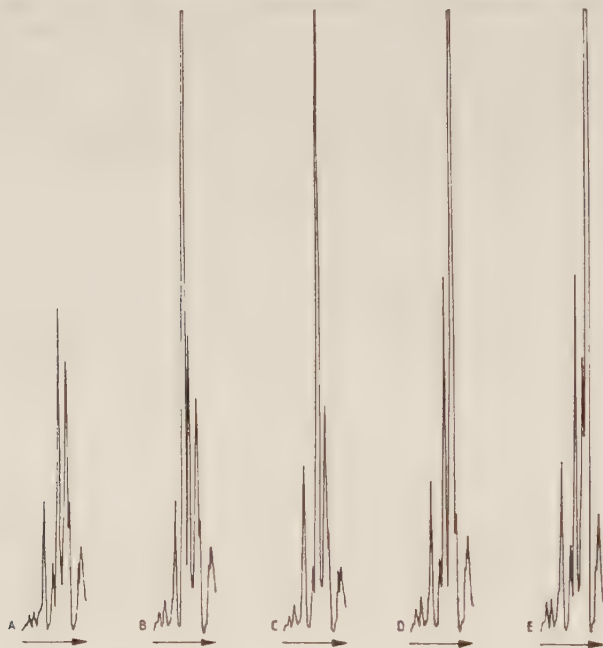


Abb. 40: Co-Chromatographie :

A: Peakgruppe aus dem *C. arietinum*-Gesamtaromagramm
 B-E: Die gleiche Gruppe mit Zuspritzung von Propylbenzol (B), 2-trans-Heptenal (C), Benzaldehyd (D) bzw. 2-Methyl-nonan (E). Näheres s. Text.

Bei der Durchführung der Co-Chromatographien war folgender Effekt zu beobachten : das mit dem Gesamtaroma beladene Tenax-Adsorptionsröhrchen war während des Zuspritzens der Referenzsubstanzen in das Probenahmekölbchen etwa 5-10 min lang einem N_2 -Strom von 60 ml/min ausgesetzt. Auch bei Raumtemperatur wurden dabei die sehr leichtflüchtigen Verbindungen aus dem *C. arietinum* - Aroma teilweise desorbiert und eluiert, wodurch deren Menge in den "Co-Chromatogrammen" reduziert war. Bei den leichtflüchtigen Alkoholen führte diese Mengenreduzierung zu wesentlich besser fokussierten Peaks, verglichen mit normalen Chromatogrammen.

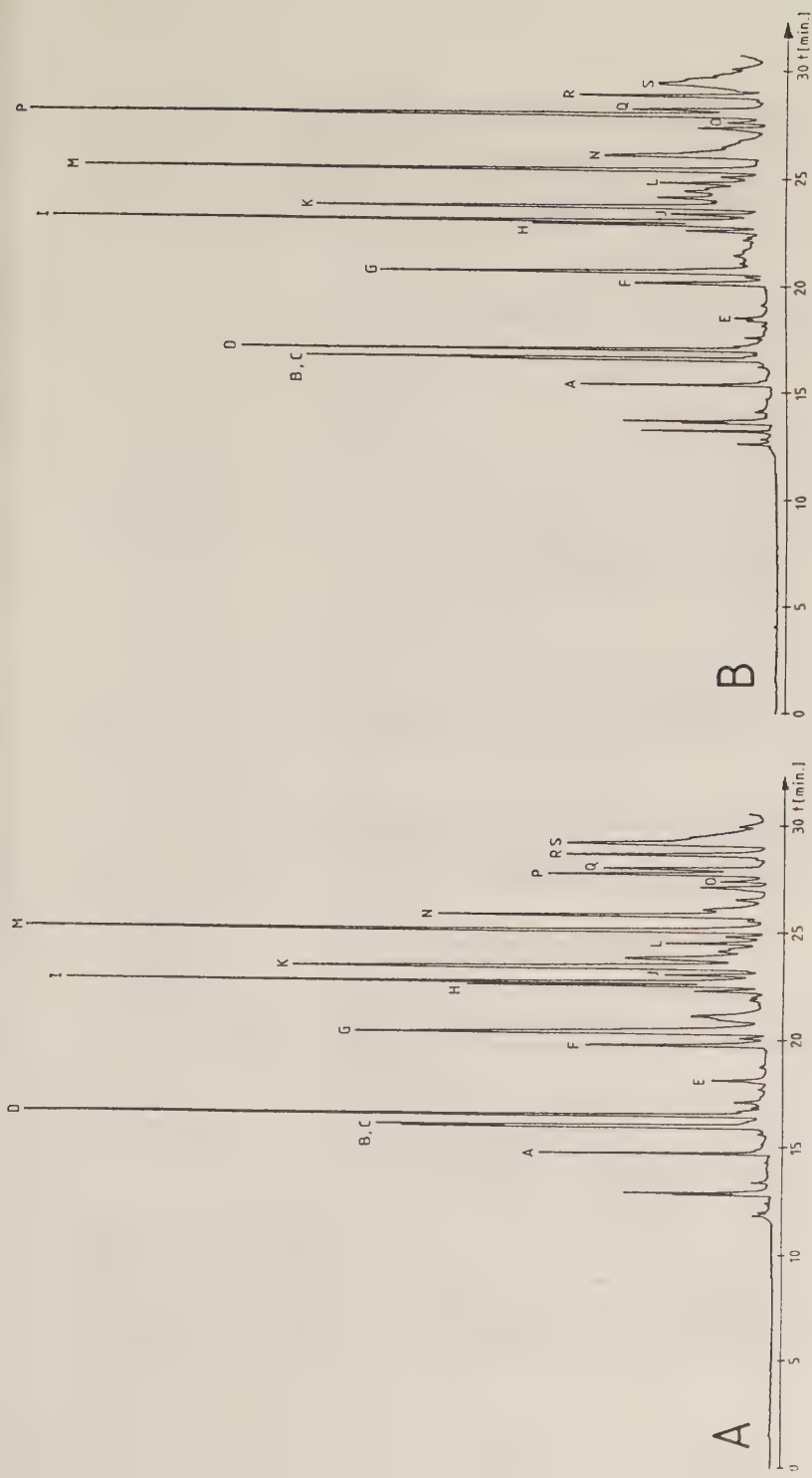


Abb. 41: Co-Chromatographie leichtflüchtiger Verbindungen :
 A: *Cicer arietinum*-Gesamtaroma (Ausschnitt),
 B: Desgl. mit Zuspritzung von 3-Methyl-butanol
 (Peak P). Die einzelnen Verbindungen sind durch
 Buchstaben gekennzeichnet (vgl. Tab. 26).

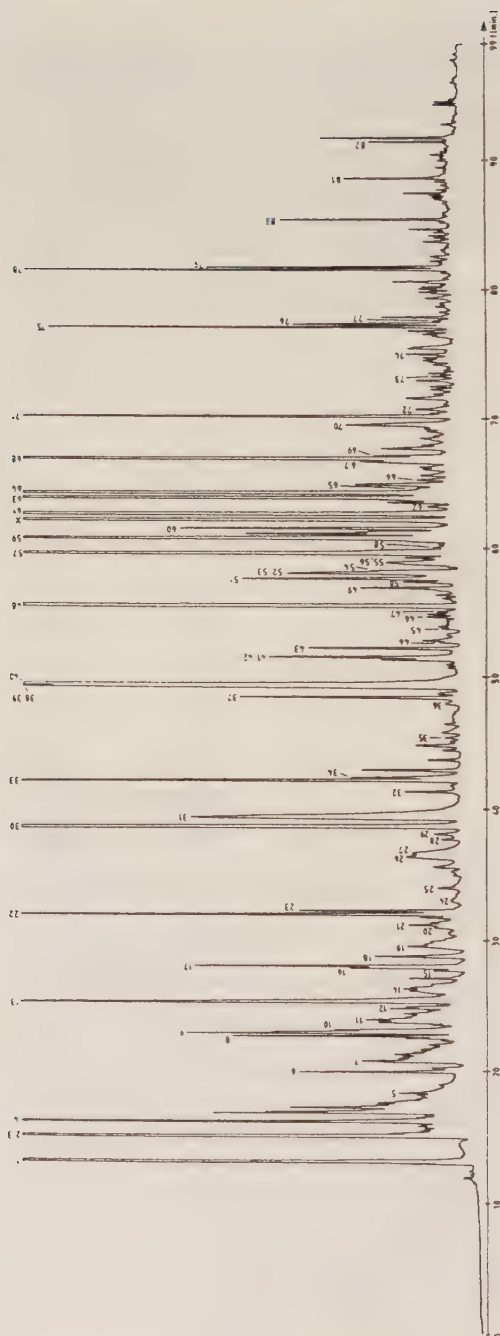


Abb. 42: Gaschromatogramm des Gesamtaromas gemahlener *Cicer arietinum*-Samen nach Headspace-Adsorption an Tenax und thermischer Desorption. Die durch Co-Chromatographie identifizierten Komponenten sind mit Nummern gekennzeichnet (vgl. Tab. 26).

Abb. 41 A zeigt diesen Effekt im Anfangsbereich eines derartigen Co-Chromatogramms (in diesem Fall wurden keine leichtflüchtigen Verbindungen zugespritzt). Die bessere Auflösung der leichtflüchtigen Substanzen in den Co-Chromatogrammen erlaubte eine zweifelsfreie Identifizierung auch der frühen Peaks durch die Zuspritz-Methode. Abb. 41 B dokumentiert dies am Beispiel des 3-Methyl-butanals (Peak P).

Durch co-chromatographische Analysen konnten insgesamt 82 Substanzidentifizierungen abgesichert werden. In keinem einzigen Fall erwies sich dabei der MS-Strukturvorschlag als falsch, was die hohe Zuverlässigkeit auch dieser Methode allein unterstreicht.

Eine Identifizierung an Hand des Massenspektrums und einer co-chromatographischen Analyse ist in Tab. 26, Spalte 5 mit "a" vermerkt. Die zugehörigen 82 Peaks sind im Gesamt-aroma-Chromatogramm der Abb. 42 und in Tab. 26, Spalte 2a mit Nummern gekennzeichnet, die leichtflüchtigen Verbindungen darunter sind wegen der besseren Auflösung zusätzlich noch in Abb. 41 A und Tab. 26, Spalte 2b aufgeführt.

6.3 Kovats - Indices

Von den 154 durch GC/MS identifizierten Verbindungen konnten 70 Substanzen nicht durch Co-Chromatographie bestätigt werden, meist weil keine authentischen Referenzsubstanzen zur Verfügung standen. In solchen Fällen war der Vergleich der Kovats-Indices mit den entsprechenden, in der Literatur tabellierten Werten hilfreich.

Die Berechnung der Kovats-Indices I erfolgte für die während der GC/MS-Analyse ermittelten Retentionswerte nach der von H. van den Dool und P.D. Kratz [70] für temperaturprogrammiertes Arbeiten modifizierten Form (vgl. dazu V.4.1):

$$I = 100 \times \frac{t_{R(X)} - t_{R(Z)}}{t_{R(Z+1)} - t_{R(Z)}} + 100 \times Z$$

mit $t_{R(X)}$, $t_{R(Z)}$, $t_{R(Z+1)}$ = Retentionszeiten der untersuchten Verbindung (X) und der 2 benachbarten n-Alkane mit Z bzw. Z+1 C-Atomen.

Diese Indices sind in Tab. 26, Spalte 4 aufgeführt. Die Berechnung wurde dadurch erleichtert, daß die Standardsubstanzen, die n-Alkane, in der Probe selbst enthalten waren.

Nur in wenigen Fällen standen Literaturangaben über Kovats-Indices zur Verfügung, die auf Säulen mit der identischen flüssigen Phase (SE 54) bestimmt worden waren; auch Literaturwerte für vergleichbare Trennphasen genügten jedoch zur Festlegung einer bestimmten Elutionsreihenfolge für Verbindungen innerhalb einer Substanzklasse. Tabelle 27 zeigt dies am Beispiel der Methyl-undecane und Terpenoide. Für den Vergleich von Kovats-Indices wurden die Literaturstellen [71] bis [77] benutzt.

Tab. 27: Vergleich der bei der GC/MS-Analyse ermittelten Kovats-Indices mit entsprechenden Literaturwerten

Verbindung	Kovats-Index GC/MS ¹⁾ Lit. ²⁾		Verbindung	Kovats-Index GC/MS ¹⁾ Lit. ³⁾	
α-Thujen	923	933			
α-Pinen	928	941			
Camphen	938	955			
β-Pinen	968	981			
Myrcen	989	984	6-M-Undecan	1154	1152
α-Phellandren	997	1004	5-M-Undecan	1156	1154
Δ-3-Caren	1004	1012	4-M-Undecan	1160	1159
κ-Terpinen	1009	1015	2-M-Undecan	1164	1164
p-Cymol	1019	1017	3-M-Undecan	1171	1170
β-Phellandren	1021	1026			
Limonen	1023	1027			
γ-Terpinen	1055	1053			
Terpinolen	1082	1082			

¹⁾ Kovats-Indices berechnet aus den Retentionsdaten der GC/MS-Analyse (SE-54-Säule)

²⁾ Kovats-Indices für Terpenoide nach Saeed [74] an einer SE-30-Säule

³⁾ Kovats-Indices für Methyl-undecane nach Schomburg [72] an einer Squalan-Säule

Insgesamt konnte für 43 noch nicht durch Co-Chromatographie bestätigte Verbindungen deren MS-Identifizierung durch einen Vergleich der Kovats-Indices mit entsprechenden Literaturangaben abgesichert werden; diese sind in Tab.26, Spalte 5 mit "b" gekennzeichnet.

6.4 Unvollständige Identifizierungen

Von den 154 Substanzen der Tabelle 26 war bei 22 Verbindungen keine eindeutige Strukturzuordnung möglich. Darunter fielen vor allem zahlreiche Dimethylalkane und mehrfach substituierte Alkylbenzole, bei denen die exakte Position der Methylverzweigung bzw. der Substituenten auf Grund des Massenspektrums allein nicht bestimmt werden konnte. Diese Verbindungen sind in Tab. 26, Spalte 5, mit "d" gekennzeichnet.

6.5 Mengenangaben, Aufteilung nach Substanzklassen

In Tab. 26, Spalte 6 finden sich Mengenangaben für die 82 durch Co-Chromatographie identifizierten Verbindungen als Anteile an der Gesamtfläche aller registrierten Peaks. Diese 82 Substanzen machten insgesamt 84% der Gesamtfläche aus; unter ihnen befanden sich bis auf 2 Ausnahmen (s.u.) alle Peaks mit einem Anteil von mehr als 0.5%. Nahm man diese

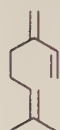
beiden größten, nicht identifizierten Peaks mit zusammen 5% Flächenanteil hinzu, so verblieben für die restlichen ca. 115 Verbindungen rund 11% der Gesamtfläche.

Da die Empfindlichkeit des FID auch von der chemischen Struktur der zu analysierenden Verbindungen abhängt, konnten diese Werte jedoch nur zu einer groben Abschätzung der jeweiligen Mengenanteile dienen. Zur Bestimmung der Absolutmengen einzelner Verbindungen s.7.2.

In Tab. 28 sind für die einzelnen Substanzklassen deren Anteile an der Gesamtpeakfläche und die Zahl der zugehörigen Verbindungen aufgelistet. Abb. 43 zeigt die Strukturformeln einiger identifizierter Terpene und Aromaten.

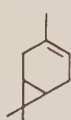
MONOTERPENE

ACYCLISCH:

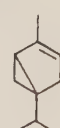


Myrcen

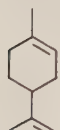
BICYCLISCH:

 α -Pinen β -Pinen Δ^3 -Caren

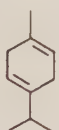
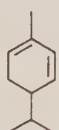
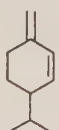
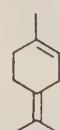
Camphen

 α -Thujen

MONOCYCLISCH:



Limonen

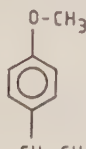
 α -Terpinen γ -Terpinen α -Phellandren β -Phellandren

Terpinolen

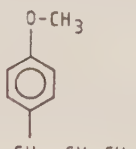
AROMATEN



p-Cymol



Anethol



Esdragol

Abb. 43: Einige im Headspace über gemahlene *C. arietinum*-Samen identifizierte Terpene und Aromaten

Tab. 28: Aufteilung der identifizierten Verbindungen aus
Cicer arietinum - Samen nach Substanzklassen

Substanzklasse	Anzahl der Verbindungen	Anteil an der Gesamtpeakfläche *)
Terpenoide	13	35.3 %
Alkohole	19	18.1 %
Aromaten	20	13.1 %
Alkane	51	9.7 %
Ketone	8	2.6 %
Aldehyde	11	2.0 %
Furane	6	0.6 %
Cycloalkane	9	0.3 %
Ester	4	0.1 %
Alkene	7	--
Sonstige	6	1.8 %
Summe :	154	83.6 %

*) Angaben nur für die 82 durch Co-Chromatographie identifizierten Peaks, bezogen auf die Gesamtfläche aller registrierten Peaks

6.6 Nicht identifizierte Verbindungen

Von den beiden nicht identifizierten Verbindungen mit einem Anteil von mehr als 0.5% an der Gesamtpeakfläche fiel eine im Gaschromatogramm mit Myrcen zusammen (Peak 59 in Abb. 42); bei der anderen handelte es sich um den in Abb. 42 mit "X" bezeichneten Peak (zwischen den Peaks 60 und 61).

Die Substanz "X" mit einem Kovats-Index von 1003 (im GC/MS-Lauf) und einem Flächenanteil von 3.7% zeigte im Massenspektrum (Abb. 44) neben einem Molekülpeak bei $m/e = 168$ den Basispeak bei $m/e = 57$, sowie eine Reihe von Signalen bei m/e -Werten, die gegenüber der für gesättigte aliphatische Kohlenwasserstoffe typischen Ionenserie um 2 Einheiten erniedrigt waren ($m/e = 41, 55, 69, 83, 97$).

Es handelte sich somit vermutlich um einen verzweigten, aliphatischen Kohlenwasserstoff mit 1 Doppelbindungsäquivalent (Summenformel: $C_{12}H_{24}$); eine genaue Strukturzuordnung war jedoch nicht möglich.

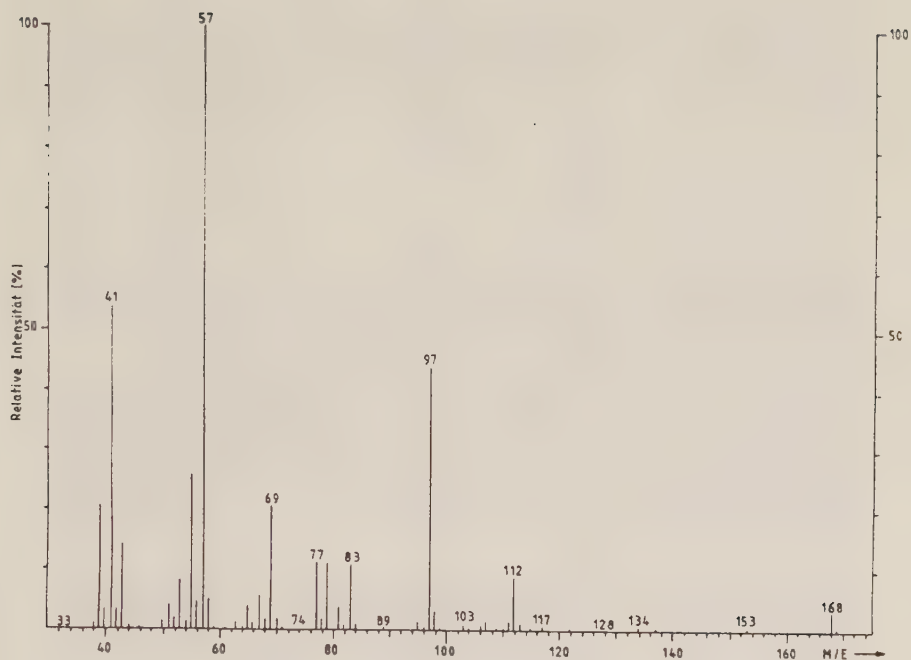


Abb. 44: Massenspektrum einer nicht identifizierten Verbindung im *C. arietinum*-Aroma (Peak "X" in Abb. 42).

7. Quantitative Analyse

Nach der Identifizierung einer Reihe flüchtiger Stoffe aus gemahlenen *C. arietinum* - Samen sollten einige Untersuchungen zur quantitativen Analyse dieser Stoffe durchgeführt werden.

7.1 Reproduzierbarkeit der Headspace-Probenahme von *Cicer arietinum* - Samen

Die Funktionsfähigkeit der Probenahmemethode und des GC-Analysenverfahrens unter qualitativen Aspekten war bereits früher nachgewiesen worden (s. Kapitel 5); für die quantitativen Arbeiten mußte zunächst überprüft werden, wie gut reproduzierbar das gesamte Analysenverfahren war.

Hierzu wurden 5 Headspace-Probenahmen gemahlener *C. arietinum*-Samen (Standardsorte) unter den üblichen Bedingungen durchgeführt; die durch thermische Desorption und anschließende GC-Analyse erhaltenen Ergebnisse wurden dann auf ihre Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Retentionszeiten (Peakzuordnung) und der absoluten Peakflächen (quantitative Aussagen) untersucht.

Auf Grund der Resultate der Versuche zur quantitativen Adsorption an Tenax (s.5.5) wurden hierbei die sehr leichtflüchtigen Stoffe außer acht gelassen und die Berechnungen auf 30 ausgewählte, größere Peaks beschränkt, beginnend mit n-Heptan (t_R : 32 min, Elutionstemperatur: 40° C).

Retentionszeiten

Tabelle 29 zeigt für diese 30 Peaks die Mittelwerte der Retentionszeiten aus 5 GC-Läufen und die entsprechenden Standardabweichungen. Erwartungsgemäß wiesen die leichtflüchtigsten Verbindungen die größten Schwankungen der Retentionszeiten auf; dabei war zu berücksichtigen, daß die Einstellung der GC-Ofentemperatur im Bereich von 0° C bis 50° C durch Einblasen von flüssigem Stickstoff erfolgte, wodurch die Exaktheit des Temperaturprogramms hier nicht mit der im höheren Temperaturbereich vergleichbar war.

Dennoch erwies sich die Reproduzierbarkeit als sehr gut : für Retentionszeiten von 32 - 45 Minuten (Ofentemperatur: 40-66° C) lagen die Standardabweichungen bei 0.6-0.1% vom jeweiligen Mittelwert, ab 45 Minuten durchweg bei 0.1% und darunter.

Tab. 29: Reproduzierbarkeit des Analysenverfahrens (Head-space-Adsorption/thermische Desorption/GC-Analyse)

Peak Nr. ¹⁾	Verbindung ²⁾	Retentionszeit ³⁾		Peakfläche ⁴⁾	
		MW (sec)	SA (%)	MW (FE)	SA (%)
22	n-Heptan	1932	0.59	277	16.8
23	2-Ethylfuran	1946	0.51	151	3.2
30	Toluol	2334	0.32	2250	8.9
31	Pentan-1-ol	2382	0.13	439	11.3
33	n-Octan	2549	0.18	445	16.4
-	n.i.	2596	0.18	51	19.9
38-40	Hexan-1-ol, p-/m-Xylol	2981	0.06	1350	8.2
-	n.i.	3102	0.10	40	13.1
41,42	o-Xylol, Heptan-2-on	3114	0.08	106	5.9
43	n-Nonan	3156	0.05	56	13.5
48	α -Pinen	3358	0.06	2700	9.1
49	Camphen	3444	0.07	70	11.1
51	2-trans-Heptenal	3487	0.06	154	13.5
52,53	Benzaldehyd, 4-Methyl-nonan	3513	0.05	161	12.3
57	β -Pinen	3607	0.05	840	9.3
59	Myrcen + n.i.	3681	0.07	577	7.2
-	n.i.	3700	0.06	114	12.2
60	n-Decan	3727	0.05	140	17.8
X	n.i.	3767	0.06	919	7.2
61	Δ -3-Caren	3795	0.06	1490	8.4
63	p-Cymol	3873	0.06	821	7.5
64	Limonen	3897	0.06	766	6.4
-	n.i.	3938	0.05	84	12.8
68	γ -Terpinen	4059	0.05	830	9.9
70	Terpinolen	4220	0.08	164	15.5
71	n-Undecan	4260	0.08	281	9.8
75	n-Dodecan	4670	0.07	166	10.4
76	Esdragol	4685	0.07	87	13.2
78	Anethol	4938	0.06	190	19.4
79	n-Tridecan	4951	0.06	96	18.7

¹⁾ Peak-Nr. in Abb. 42

²⁾ n.i. = nicht identifiziert

³⁾ Mittelwert (in sec) und Standardabweichung (in % vom Mittelwert) aus 5 GC-Läufen

⁴⁾ Mittelwert (in Flächeneinheiten) und Standardabweichung (in % vom Mittelwert) aus 5 GC-Läufen

Peakflächen

Tab. 29 zeigt für die obigen 30 Peaks die Mittelwerte der Peakflächen aus 5 GC-Läufen, gemessen in Flächeneinheiten, und deren Standardabweichungen. Bei der Bewertung dieser Ergebnisse war zu bedenken, daß die gefundenen Schwankungen die Fehler der gesamten Probenahme, nicht nur der GC-Analytik enthielten.

Insbesondere kamen als Fehlerquellen in Frage :

- Unterschiede im *C. arietinum*-Samenmaterial (z.B.: Wassergehalt, Alter)
- Einwaage der Samen (es wurden nur ganze Samen eingewogen)
- Schwankungen beim Mahlvorgang (Kühlung, Dauer)
- Verluste an flüchtigen Stoffen bei der Überführung des Mehls in den Probenahmekolben
- Schwankungen der Probenahme-Bedingungen (Badtemperatur, Gasfluß, Adsorptionsdauer, Temperatur des Adsorptionsröhrchens)
- GC-Analyse (thermische Desorption, Detektorempfindlichkeit)

Für alle untersuchten Verbindungen lagen die Standardabweichungen unter 20% des jeweiligen Mittelwerts, was unter Berücksichtigung des oben Gesagten als zufriedenstellend erschien. Bei allen in größerer Menge vorliegenden Terpenen betrug die Standardabweichung sogar weniger als 10% (s.Tab. 29).

7.2 Bestimmung der Absolutmengen an 2 Beispielen

Als Ergebnis der bisherigen Versuche konnte für die Verbindungen des *C. arietinum*-Gesamtaromas deren Menge, jedoch nur gemessen als Flächeneinheiten der jeweils zugehörigen Peaks, angegeben werden. Um die Flächeneinheiten mit den absoluten Stoffmengen korrelieren zu können, wurden für 2 Substanzen Eichmessungen durchgeführt und die entsprechenden Korrekturfaktoren ermittelt (quantitative Analyse mit externem Standard).

Durch exakte Einwaage von Pentan-1-ol bzw. Δ -3-Caren erhaltene Stammlösungen in Isopropanol bzw. n-Pentan (vgl. III.1.4.2) wurden bis auf eine Konzentration von ca. 100 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt; 1 μl dieser Eichlösung (entsprechend etwa 100 ng Substanz) wurde in die Tenax-Packung eines Adsorptionsröhrchens injiziert und mit der üblichen thermischen Desorptionsmethode im GC analysiert. Pro Substanz wurden 4 GC-Läufe aus je 2 verschiedenen Stammlösungen durchgeführt.

Die ermittelten Korrekturfaktoren betrugen für Pentan-1-ol $645 \pm 21 \times 10^3$ Flächeneinheiten/100 ng und für Δ -3-Caren $905 \pm 23 \times 10^3$ FE/100 ng (Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus 4 GC-Läufen). Die Differenz zwischen den beiden Korrekturfaktoren resultierte aus der unterschiedlichen Empfindlichkeit (Response) des FID für Substanzen verschiedener chemischer Struktur.

In der Literatur sind für eine Reihe von Verbindungen derartige FID-Response-Faktoren tabelliert; diese werden

dabei relativ zu n-Heptan angegeben, dessen Faktor definitionsgemäß gleich 1.0 gesetzt wird. Nach Schomburg [67] und Dietz [78] liegen die relativen FID-Response-Faktoren für aliphatische Kohlenwasserstoffe (n-Alkane, methylverzweigte Alkane, Alkene, Cycloalkane) bei 1.0, der für Pentan-1-ol beträgt dagegen 0.71.

Setzte man den bei uns ermittelten Responsefaktor für Δ -3-Caren (905×10^3 FE/100 ng) gleich 1.0, so ergab sich der relative Faktor von Pentan-1-ol (645×10^3 FE/100 ng) ebenfalls zu 0.71; es bestand also eine hervorragende Übereinstimmung mit der Literatur.

Somit konnten die bei einer Standardprobenahme aus *C. arietinum*-Samen erfaßten Absolutmengen an Pentan-1-ol und Δ -3-Caren direkt angegeben werden, während für eine Reihe weiterer Verbindungen die Berechnung der Absolutmengen unter Benutzung von FID-Response-Faktoren aus der Literatur [78] erfolgte (s.Tab. 30).

Tab. 30: Durch eine Standardprobenahme aus gemahlten *Cicer arietinum*-Samen erfaßte Mengen einiger Verbindungen

Verbindung	Peak Nr. ¹⁾	Menge (ng)	Verbindung	Peak Nr. ¹⁾	Menge (ng)
Butan-1-ol	19	16	Myrcen	59	32 ²⁾
Pentan-1-ol	31	68	Limonen	64	85
Hexan-1-ol	40	163	γ -Terpinen	68	92
			Terpinolen	70	18
Hexanal	34	8	α -Pinen	48	298
Decanal	77	2	Camphen	49	8
2-trans-Hexenal	36	2	β -Pinen	57	93
2-trans-Heptenal	51	22	Δ -3-Caren	61	165
			p-Cymol	63	92
n-Heptan	22	31			
n-Octan	33	51	Toluol	30	232
n-Nonan	43	6	p-/m-Xylol	38,39	28
n-Decan	60	15	Propylbenzol	50	3
n-Undecan	71	31	Cumol	46	2
n-Dodecan	75	18	Benzaldehyd	52	14 ²⁾
n-Tridecan	79	11			

¹⁾ Peak-Nr. in Abb. 42

²⁾ Zu den Mengenangaben für Myrcen und Benzaldehyd s. Text

Eine zusätzliche Schwierigkeit ergab sich dadurch, daß in Peak 59 (Abb. 42) Myrcen und eine nicht identifizierte Verbindung zusammenfielen. Da jedoch diese beiden Komponenten im GC/MS-Lauf angetrennt waren, wurde deren Mengenverhältnis über den Gesamtionenstrom abgeschätzt (ca.1:1) und bei der obigen Berechnung berücksichtigt. In analoger Weise wurde für Benzaldehyd und 4-Methyl-nonan (Peak 52/53 in Abb. 42) ein Verhältnis von etwa 3:1 ermittelt.

Es sei nochmals ausdrücklich darauf hingewiesen, daß die flüchtigen Stoffe aus *C. arietinum* - Samen durch die angewandte Headspace-Adsorption keineswegs quantitativ "extrahiert" wurden; Ziel war es ja vielmehr gewesen, ein repräsentatives Aromamuster zu erhalten. Die obigen Mengenangaben bezogen sich also auf ein Headspace-Volumen von 1.5 l, wie es bei einer Standardprobenahme aus gemahlenden Kichererbsensamen erfaßt wurde.

Die Gesamtmenge der dabei auf einem Tenaxröhrchen adsorbierten Stoffe betrug ca. 2.4 µg (berechnet als Terpene). α-Pinen war mit 298 ng die in der größten Menge enthaltene Verbindung.

8. Quantitative Analysen zum biologischen Test

8.1 Desorption des *Cicer arietinum* - Gesamtaromas von Tenax unter Biotest - Bedingungen

Im Biotest sollte die Reaktion der Larven auf das an Tenax adsorbierte Gesamtaroma gemahlener *C. arietinum* - Samen untersucht werden. Zu diesem Zweck mußte die Desorption der flüchtigen Stoffe vom Tenaxröhrchen möglichst kontinuierlich und über einen längeren Zeitraum anhaltend erfolgen.

Biotest-Simulierung im GC

In einem ersten Versuch wurde daher überprüft, ob es möglich war, die an Tenax adsorbierten Stoffe nicht schnell und quantitativ, wie bei der normalen GC-Analyse (150° C, 10 min), sondern langsam und unvollständig zu desorbieren. Ein unter Standardbedingungen (III.3.2) mit *C. arietinum*-Gesamtaroma beladenes Tenaxröhrchen wurde dazu im GC bei 38° C 45 Minuten lang desorbiert, was der Zeitdauer eines Biotests entsprach. Alle anderen Zeitparameter des GC-Programms wurden entsprechend verschoben; ansonsten blieb die Analysenmethode unverändert. Anschließend desorbierte man das Röhrchen mit der normalen Analysenmethode, um die auf dem Röhrchen verbliebenen Substanzen zu erfassen.

Für diesen Versuch wurde nicht die Standardsorte, sondern eine andere Charge käuflicher Kichererbsensamen verwendet. Abb. 45 zeigt drei Chromatogramme dieser Charge : a) das Gesamtaroma unter normalen Analysenbedingungen (oben), b) das Gesamtaroma mit einer Desorption bei 38° C für 45 Minuten (Mitte) und c) den nach dieser Desorption noch auf dem Röhrchen verbliebenen Rest (unten).

Aus Abb. 45 ging klar hervor, daß nach 45-minütiger Desorption bei 38° C die leicht flüchtigen Stoffe (t_R im normalen Programm: 10-30 min, Elutionstemperatur: 0-36° C) nahezu quantitativ desorbiert worden waren, im mittleren Bereich (30-68 min bzw. 36-112° C) eine teilweise Desorption erfolgt war und die schwerer flüchtigen Stoffe (Elution ab

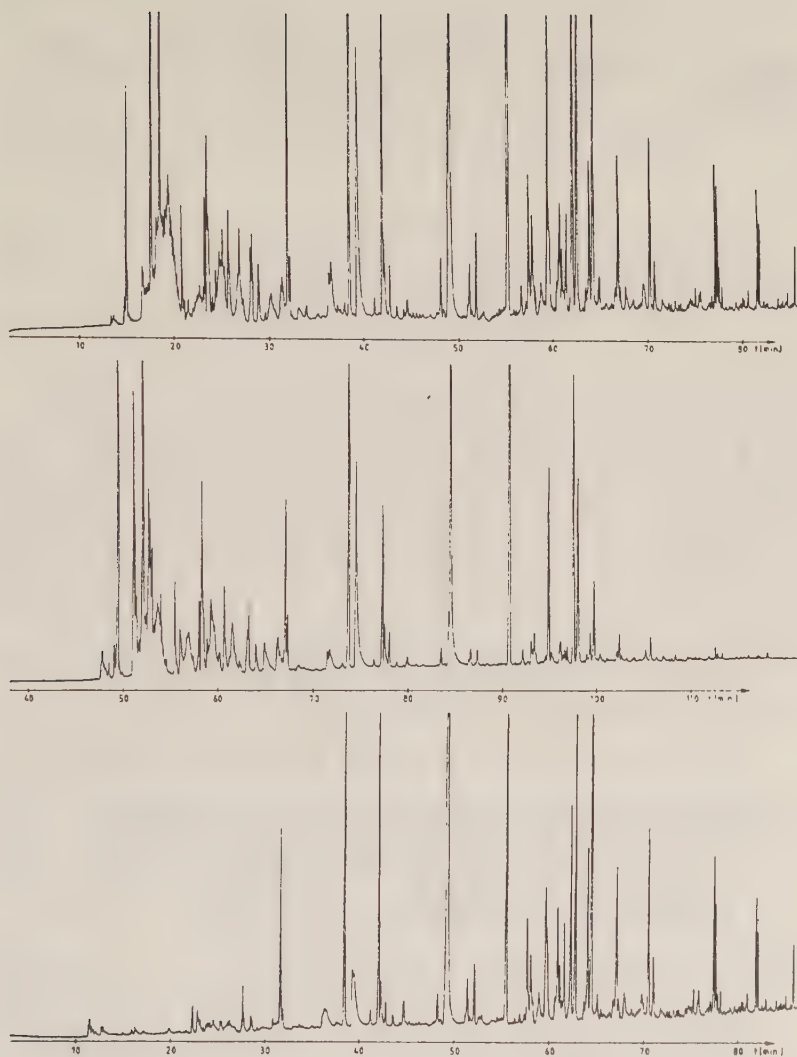


Abb. 45: Gaschromatogramme des *C. arietinum*-Gesamtaromas:
 oben: thermische Desorption bei 150° C für 10 min,
 Mitte: thermische Desorption bei 38° C für 45 min,
 unten: nach letzterer Desorption auf dem Röhrchen
 verbliebener Rest. (Näheres s. Text).

112° C bzw. nach 68 min) praktisch quantitativ am Tenax adsorbiert blieben.

Abb. 46 zeigt diese Abhängigkeit der Desorption vom jeweiligen Siedepunkt für einige n-Alkane, Alkohole und Terpene.

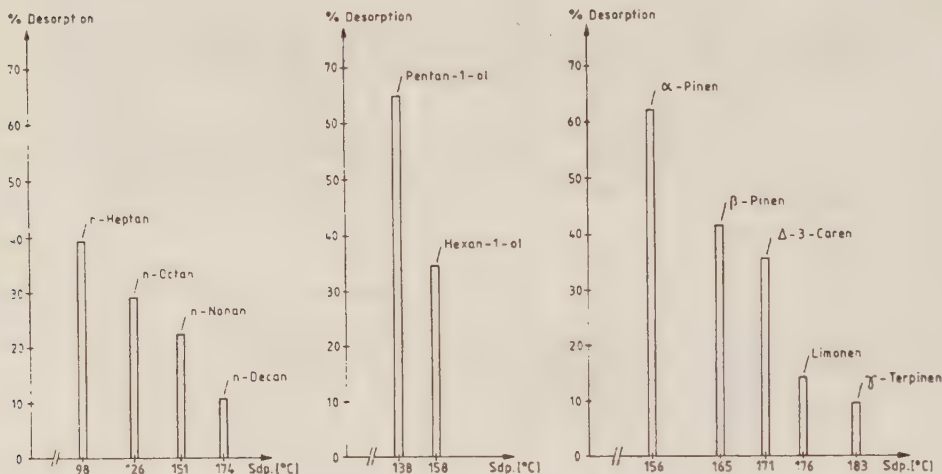


Abb. 46: Desorption verschiedener Komponenten des *C. arietinum* - Gesamtaromas (bei 38° C für 45 min) in Relation zu ihren Siedepunkten

Diese Versuchsergebnisse ließen folgende Schlüsse zu :

- (1) Auch bei einer 45-minütigen Desorption im GC bei 38° C und 20 ml He / min (vom analytischen Standpunkt her unsinnige Bedingungen !) konnte während der Kühlphase keinerlei Substanzdurchbruch beobachtet werden, d.h. die Vorsäule des GC-Systems zeigte bei -150° C eine sehr hohe Adsorptionskapazität.
- (2) Die Desorptionsbedingungen (38° C, 45 min) erschienen als sinnvoller Kompromiß für den Larventest, weil unter diesen Umständen zumindest von den mittelflüchtigen Stoffen noch erhebliche Mengen freigesetzt wurden, ohne daß die Gefahr einer allzu raschen Elution der leichtflüchtigen Stoffe bestand.

Jedoch entsprachen die Desorptionsbedingungen im GC nicht exakt denen im Larventest : als Trägergas diente Helium an Stelle von angefeuchteter Luft und der Gasfluß betrug 20 ml/min gegenüber 13 ml/min im Test. Darüber hinaus erschien zur Bewertung der Desorption auch deren zeitlicher Verlauf interessant, nicht nur die Gesamtdesorption nach 45 min.

Desorption des Gesamtaromas unter Testbedingungen

Daher wurde ein nach der üblichen Methode mit dem Gesamtaroma aus *C. arietinum*-Samen (Standardsorte) beladenes Tenaxröhrchen unter Testbedingungen in einem Wasserbad desorbiert (s.III.3.6): als Desorptionsgas diente angefeuchtete Luft (13 ml/min), desorbiert wurde 45 min lang bei 38° C Badtemperatur.

Das zur Readsorption der desorbierten Stoffe angebrachte Tenaxröhrchen (Nr.(12) in Abb. 22) wurde nach 15 und 30 min erneuert. Durch anschließende thermische Desorption und GC-Analyse konnten so die in den verschiedenen Zeitabschnitten (0-15, 15-30 und 30-45 min) desorbierten Anteile sowie die auf dem ursprünglichen Adsorptionsröhrchen (Nr.(11) in Abb. 22) verbliebene Menge ermittelt werden.

In Abb. 47 ist der zeitliche Verlauf der Desorption für eine Reihe von Verbindungen, geordnet nach Substanzklassen, dargestellt. Bei allen untersuchten Stoffen ergab sich dabei der gleiche charakteristische Kurvenverlauf, lediglich einige sehr leichtflüchtige Verbindungen zeigten eine etwas abweichende Kinetik (Abb. 47 A). Die nach 45 min insgesamt desorbierten Anteile stimmten gut mit den Ergebnissen des obigen GC-Simulierungsversuches überein, nur beim α -Pinen wichen die Resultate etwas voneinander ab (50.4% gegenüber 62.1%).

Zur Abschätzung der im Larventest effektiv wirksamen Substanzmengen wurden für die 4 Komponenten des im Biotest attraktiven Gemisches (s.3.5) sowie für das im Test abstoßend wirkende 2-trans-Heptenal die während der einzelnen Zeitabschnitte der Desorption tatsächlich freigesetzten Stoffmengen berechnet (Tab. 31).

Tab. 31: Im Verlauf des Biotests freigesetzte Mengen einiger Komponenten des *Cicer arietinum* - Gesamtaromas (Desorption von Tenax bei 38° C für 45 min)

Verbindung	Adsorbierte *) Menge (ng)	Desorbierte Menge (ng)		
		0-15 min	15-30 min	30-45 min
Pentan-1-ol	68	24	11	8.4
α -Pinen	298	72	47	32
Myrcen	32	5.6	3.3	1.9
Δ -3-Caren	165	24	14	8.9
2-trans-Heptenal	22	1.7	0.4	0.4

*) Standardadsorption aus gemahlenden *C. arietinum*-Samen

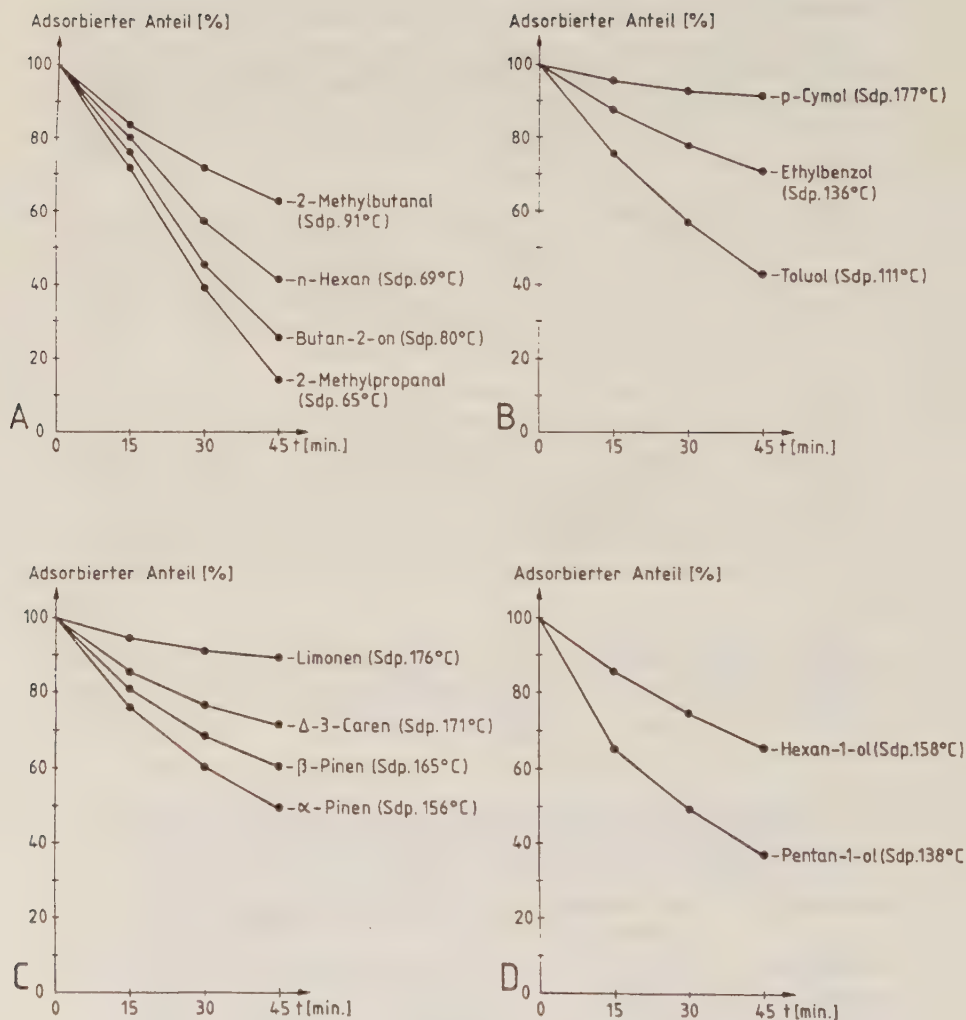


Abb. 47: Kinetik der Desorption des *C. arietinum*-Gesamtaromas unter den Bedingungen des Biotests für einige sehr leichtflüchtige Komponenten (A), Aromaten (B), Terpene (C) und Alkohole (D). Näheres s. Text.

Von großer Bedeutung für den biologischen Test war die Frage, wie stark sich im Verlauf der Desorption die Mengenverhältnisse der einzelnen Komponenten zueinander veränderten. Ließ man hierzu die sehr leichtflüchtigen Verbindungen (Elutionstemperatur im GC $< 30^{\circ}\text{C}$) außer acht und betrachtete für die einzelnen Zeitabschnitte der Desorption die Größenverhältnisse von 10 mengenmäßig wichtigen Substanzen aus verschiedenen Stoffklassen (berechnet als %-Anteile an der Gesamtfläche dieser 10 Peaks), so ergab sich folgendes Bild (Tab. 32):

Tab. 32: Veränderung der Zusammensetzung des während des Biotests von Tenax desorbierten Stoffgemisches (nähere Erläuterungen s. Text)

Verbindung	Sdp. ($^{\circ}\text{C}$)	% - Anteil an der Gesamtpeakfläche *)		
		0-15 min	15-30 min	30-45 min
2-Methyl-butanol	91	0.8	0.8	0.9
n-Heptan	98	3.2	3.5	4.3
Toluol	111	18.8	20.9	22.0
n-Octan	126	4.8	5.2	6.0
Ethylbenzol	136	0.7	0.8	0.8
Hexan-1-ol	158	11.5	13.0	14.7
α -Pinen	156	37.3	35.8	33.5
β -Pinen	165	7.6	7.2	6.4
Δ -3-Caren	171	13.8	11.4	10.3
p-Cymol	177	1.5	1.4	1.1
Summe :		100.0	100.0	100.0

*) = Gesamtpeakfläche der 10 aufgeführten Verbindungen

Zwar konnten für die einzelnen Substanzen im zeitlichen Verlauf durchaus unterschiedliche Tendenzen festgestellt werden (so nahm z.B. der relative Anteil der Terpene gegenüber den anderen Komponenten durchweg ab), aber diese Differenzen waren nicht sehr stark ausgeprägt. Die größte Veränderung ergab sich im Verhältnis Δ -3-Caren : Hexan-1-ol, das von anfänglich 1 : 0.8 auf letztlich 1 : 1.4 absank.

In erster Annäherung konnte man somit die Mengenverhältnisse der obigen Substanzen (Siedepunktsbereich: $91\text{--}177^{\circ}\text{C}$) für die Dauer des Biotests als relativ stabil betrachten.

8.2 Reproduzierbarkeit der Headspace-Probenahme von synthetischen Stoffen

Zur Untersuchung im Larventest sollte für eine Reihe von Reinstoffen eine definierte Stoffmenge aus dem Headspace an Tenax adsorbiert werden. Es galt daher zu überprüfen, wie reproduzierbar sich die Handhabung derart geringer Mengen gasförmiger Substanzen (Nanogramm-Bereich) mit der angewandten Technik (s. III.3.3) gestalten ließ.

Die gewünschte Konzentration sollte dabei, je nach der zu untersuchenden Substanz, durch Variation verschiedener Parameter erreicht werden (Temperatur des Probengefäßes mit der Referenzsubstanz, injiziertes Headspace-Volumen, Adsorptionsdauer etc.).

Für 4 Verbindungen unterschiedlicher chemischer Struktur und Flüchtigkeit wurde die Reproduzierbarkeit der Probenahme (4 Wiederholungen) durch anschließende GC-Analyse überprüft (Tab. 33).

Tab. 33: Reproduzierbarkeit der Headspace - Probenahme synthetischer Reinstoffe (4 Wiederholungen)

Verbindung	:n-Octan	Pentan-1-ol	Myrcen	Hexan-1-ol
Temperatur				
der Probe (° C) :	20	37	20	47
injiziertes Volumen				
Headspace (µl) :	0.5	4.0	0.5	10.0
Peakfläche (FE) *) :	532	726	497	1353
St.abw. (%) **) :	12.9	20.4	8.7	15.9

*) Mittelwert der Peakflächen (in Flächeneinheiten (FE)) aus 4 GC-Läufen

**) Standardabweichung der Peakflächen (in % vom Mittelwert)

Die Standardabweichungen der erhaltenen Peakflächen lagen mit 9-20% vom jeweiligen Mittelwert in einem akzeptablen Bereich.

Für die Headspace-Adsorption eines Gemisches dreier Terpene (α -Pinen, Myrcen, Δ -3-Caren) wurde die Reproduzierbarkeit in analoger Weise überprüft (4 Wiederholungen). Die Standardabweichungen bewegten sich dabei für die Mengen der 3 Komponenten zwischen 15.5 und 16.6% vom jeweiligen Mittelwert, also in einer ähnlichen Größenordnung wie oben. Die Mengenverhältnisse der 3 Terpene zueinander waren hervorragend reproduzierbar (Standardabweichungen: 1.7 bis 3.7% vom betreffenden Mittelwert).

8.3 Desorption von Reinstoffen unter Testbedingungen

Mit dem Headspace von Reinsubstanzen beladene Tenaxröhrchen wurden für 2 Verbindungen (Δ -3-Caren und Pentan-1-ol) nach durchlaufenem Biotest einer GC-Analyse unterzogen, um so die Desorptionsrate dieser Einzelsubstanzen unter Testbedingungen zu ermitteln.

Die gefundenen Werte für die während des Tests desorbieren Anteile lagen bei beiden Verbindungen geringfügig höher als im obigen Versuch mit dem Gesamtaroma (33% gegenüber 29% für Δ -3-Caren, 68% gegenüber 63% bei Pentan-1-ol); unter Berücksichtigung der Schwankungsbreite für die Headspace-Adsorption synthetischer Stoffe erschien diese Abweichung jedoch als unerheblich.

9. Untersuchung indischer *Cicer arietinum* - Varietäten

Im Hinblick auf geplante Arbeiten zur Charakterisierung verschiedener *C. arietinum*-Varietäten im Feld an Hand der von den grünen Pflanzenteilen emittierten flüchtigen Stoffe sollte in einem Vorversuch an Samenmaterial überprüft werden, ob die ausgearbeitete Analysenmethode prinzipiell zu einer derartigen Sortendifferenzierung geeignet war.

Vom ICRISAT wurden dazu die Samen dreier Varietäten vom Desi-Typ ("Annigeri", "ICC-506" und "ICCX-730266"), jeweils von 2 Erntejahrgängen (83/84 und 84/85) zur Verfügung gestellt (s.III.1.3.2), die sich zudem im Feldversuch in ihrer Anfälligkeit gegenüber *H. armigera* unterschieden (Tab. 34).

Tab. 34: Anfälligkeit verschiedener *Cicer arietinum*-Sorten gegenüber *Heliothis armigera*. Ergebnisse von Feldversuchen unter insektizidfreien Bedingungen am ICRISAT, Patancheru, Indien *)

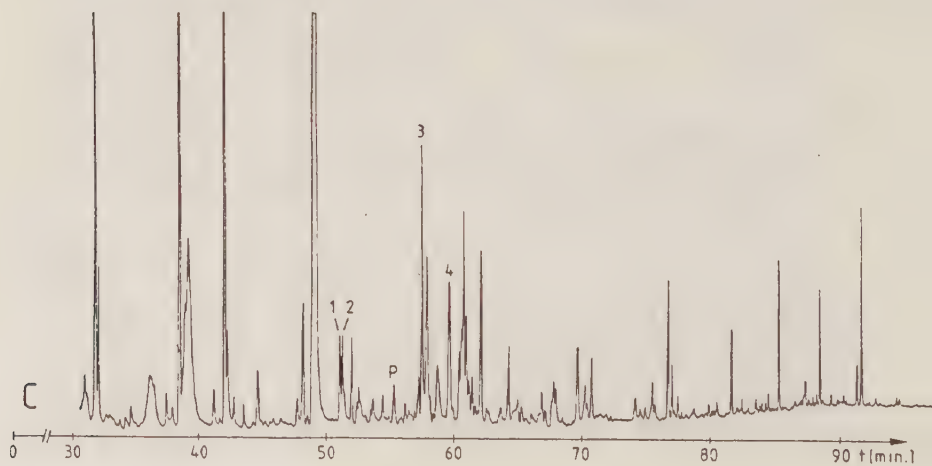
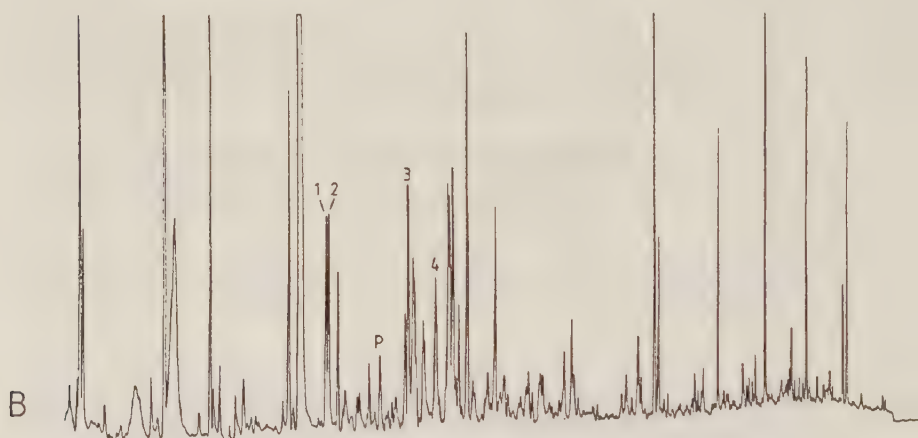
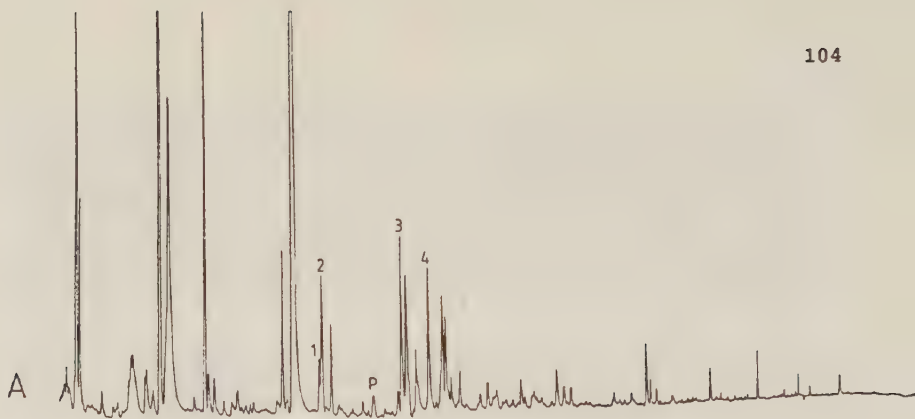
Sorte	Anteil an durch <i>Heliothis</i> geschädigten Hülsen					
	79/80	80/81	81/82	82/83	83/84	84/85
ICC-506	6%	4%	5%	7%	12%	1%
Annigeri	16%	20%	15%	29%	29%	15%
ICCX-730266	23%	23%	15%	33%	30%	19%

*) Schadensdaten nach ICRISAT Annual Report 1985 [79] und S.S. Lateef [17].

Typische, mit der üblichen Probenahme- und Analysenmethode erhaltene Chromatogramme dieser 3 Sorten (Saison 83/84) zeigt Abb. 48 A-C; der für quantitative Aussagen nicht verwendbare Abschnitt der sehr leichtflüchtigen Verbindungen wurde der besseren Übersichtlichkeit wegen weggelassen.

Im Bereich bis zu einer Retentionszeit von ca. 50 min stimmten die Peakmuster der 3 Chromatogramme untereinander und mit dem der handelsüblichen Kabuli-Standardsorte qualitativ und quantitativ weitgehend überein (vgl. Abb. 48 A-D). Dagegen unterschieden sich die 3 indischen *C. arietinum*-Sorten bei den schwerer flüchtigen Verbindungen ($t_R > 50$ min) sowohl untereinander als auch von der handelsüblichen Standardsorte erheblich.

Zwar standen für die drei indischen Varietäten keine GC/MS-Analysen zur Verfügung, so daß für die Peaks in deren Chromatogrammen keine Strukturzuordnungen möglich waren; jedoch fiel auf, daß bei allen drei Desi-Sorten die im Monoterpenbereich eluierten Substanzmengen, verglichen mit der Kabuli-Standardsorte, sehr gering waren. So fanden sich etwa bei der Retentionszeit des im Standardchromatogramm größten Peaks (α -Pinen, $t_R = 55.5$ min) bei den 3 indischen Sorten nur Peaks von untergeordneter Größe (Peaks "P" in Abb. 48).



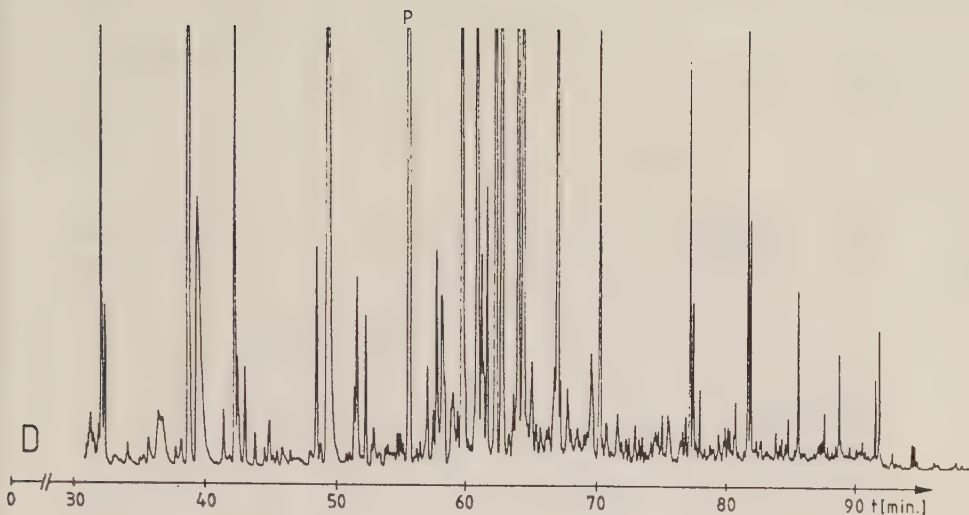


Abb. 48: Gaschromatogramme des Gesamtaromas gemahlener Samen verschiedener *Cicer arietinum* - Varietäten :
 S. 104: ICC-506 (A), ICCX-730266 (B), Annigeri (C).
 S. 105: Handelsübliche Standardsorte (D).
 Zu den Peaks 1 bis 4 und P s. Text.

Auf der Grundlage von 3 Probenahmen mit den Samen der Saison 84/85 und einer Analyse der Samen von 83/84 wurde für diese 3 Sorten ein Versuch zur Charakterisierung unternommen. Dazu dienten 4 Peaks, die in allen 3 Varietäten jeweils in beiden Jahrgängen mit annähernd reproduzierbaren Flächen auftraten (Peaks 1-4 in Abb. 48) und die sich in ihrer Fläche von Sorte zu Sorte unterschieden.

Um den Einfluß der Schwankungen in den erfaßten absoluten Stoffmengen so klein wie möglich zu halten, wurden Peakflächen-Verhältnisse gebildet (Peak 2 : Peak 1 und Peak 3 : Peak 4) und für die 3 Sorten (jeweils 4 Proben, s.o.) gegeneinander aufgetragen (Abb. 49; Darstellung nach Jurs et.al. [80]). Dabei schien, trotz einer erheblichen Streuung der Werte, eine Abgrenzung der 3 Sorten vertretbar.

Es sei jedoch ausdrücklich betont, daß die Anzahl sowohl der untersuchten *C. arietinum*-Sorten als auch der Jahrgänge und Probenahmen viel zu gering war, um eine Aussage über die Verlässlichkeit dieser Zuordnungen treffen zu können. Prinzipiell aber erschien die ausgearbeitete Methode geeignet, qualitative und quantitative Unterschiede zwischen verschiedenen *C. arietinum*-Sorten nachzuweisen.

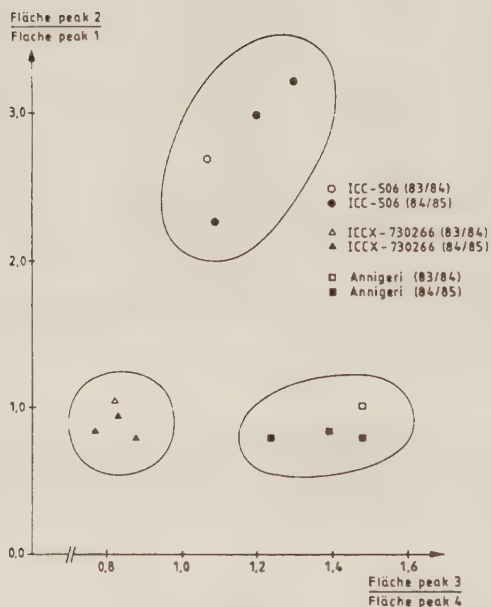


Abb. 49: Unterscheidung verschiedener *C. arietinum*-Varietäten an Hand von vier ausgewählten Peaks in deren Gesamtaromagrammen (Peaks 1-4 in Abb. 48 A-C). Darstellung nach Jurs et.al. [80]. Erläuterungen s. Text.

V. Diskussion

1. Biologischer Test

Um den Einfluß flüchtiger Stoffe auf *H. armigera* - Larven studieren zu können, stehen prinzipiell verschiedene Methoden zur Wahl. Elektrophysiologische Untersuchungen (z.B. Elektroantennogramme) können zwar aufklären, auf welche Stoffe die Chemorezeptoren des Insekts besonders stark ansprechen. Aussagen über die Natur dieser Effekte (stimulierende oder repellierende Wirkung) oder gar über das resultierende Verhalten des Insekts sind auf dieser Ebene jedoch nicht möglich (Whitehead [81]). Feldversuche unterliegen stets unkontrollierbaren und stark schwankenden Umweltbedingungen und erlauben daher kaum eine gezielte Untersuchung einzelner Aspekte der Pflanze-Insekt-Wechselbeziehung (Payne et.al. [82]). Ein verlässlicher Verhaltenstest im Labor erschien daher für das vorliegende Problem am besten geeignet.

1.1 Testaufbau

Insgesamt kamen vier verschiedene Testanordnungen zum Einsatz: der Glastunneltest, der modifizierte Glastunneltest, das Y-Olfaktometer und die Dreizack-Anordnung (vgl. III.2). Die Gründe für die letztendliche Verwendung des Dreizacks und das Verwerfen der drei anderen Anordnungen sollen im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

Aus der Literatur ist bekannt, daß bei der Orientierung von Insekten, etwa zu ihrer Wirtspflanze, chemische und visuelle Stimuli synergistisch zusammenwirken; dies gilt sowohl im Feld (Finch [83]), als auch in Verhaltensversuchen im Labor (Khattar und Saxena [84]). Zum Nachweis einer attraktiven Wirkung flüchtiger Stoffe muß daher jede Möglichkeit der Beeinflussung durch optische Reize ausgeschlossen werden.

Aus diesem Grund wurde der Glastunnel-Test, bei dem die Duftquelle für die Larven einsehbar war, verworfen, nachdem die Attraktivität der Farbe Gelb für *H. armigera*-Larven einwandfrei bewiesen worden war (s.IV.2.1). Bei den weiteren Testaufbauten wurde konsequent darauf geachtet, daß die Larven keinen Sichtkontakt zur Geruchsquelle hatten.

Andererseits kann die unnatürliche Situation einer strikten Trennung von visuellen und chemischen Stimuli in einem Verhaltenstest dazu führen, daß die Insekten nicht mehr in normaler Weise auf die flüchtigen Stoffe reagieren (Finch [83]). Das Unterlegen der gesamten Dreizack-Anordnung mit gelbem Karton bewirkte jedoch im endgültigen Testaufbau, daß die Larven zwischen gelber Farbe + Geruch auf der einen und gelber Farbe allein auf der anderen Seite wählen konnten. Ein völlig symmetrischer Aufbau der Testapparatur und eine homogene Ausleuchtung der Testarena sollten darüber

hinaus alle sonst denkbaren, einseitigen optischen Reize ausschließen.

Der Geruchssinn von Lepidopteren-Larven ist auf Grund des relativ einfachen Aufbaus der zugehörigen Organe sehr gut untersucht. Die etwa 78 Geruchsrezeptoren der Raupen sitzen auf den Antennen und Maxillen (Dethier [85], Schoonhoven und Dethier [86], Baker et.al. [87]). Diese olfaktorischen Rezeptoren können jedoch in unbewegter Luft eine Geruchsquelle nur bei sehr steilen Konzentrationsgradienten des betreffenden Geruchsstoffs lokalisieren, und selbst dann ist eine attraktive Wirkung nur in einer Entfernung von 0.5 bis 4 cm von der Geruchsquelle nachweisbar (Visser [88]).

In der Natur benutzen die Insekten vielmehr einen anderen Mechanismus zu ihrer Orientierung: sobald ein attraktiver Geruch eine gewisse Schwellenkonzentration übersteigt und von den Rezeptoren registriert wird, signalisiert dies dem Tier, sich gegen die - im Feld lokal fast immer vorhandene - Luftströmung zu orientieren (Schneider [89]). Ein attraktiver Geruchsreiz ist somit nur der Auslöser für eine Strömungsorientierung, wobei als richtender Faktor allein die Luftströmung, nicht ein Konzentrationsgefälle fungiert (Geruch-induzierte Anemotaxis). Luftströmungen ohne Geruch wirken dagegen nicht orientierend (Visser [65], Schwink [90]).

Für den Aufbau von Verhaltenstests folgt daraus, daß die Ausbreitung des zu testenden Duftstoffs in der Apparatur nicht nur auf Diffusion beruhen sollte. Vorzuziehen sind vielmehr Anordnungen, in denen den Insekten die zu untersuchenden Gerüche in Form von duftstoffhaltigen Luftströmungen angeboten werden, da der Luftstrom nicht nur der Verteilung des Geruchsstoffs dient, sondern das Insekt auch zur Duftquelle führt (Visser [65]). Optimal sind dabei Biotests, in denen das Insekt zwischen einem beladenen und einem unbeladenen Luftstrom wählen kann, so daß, unabhängig von der getroffenen Entscheidung, stets eine Orientierung gegen den "Wind" möglich ist. Dabei ist allerdings auf eine klare Trennung der beiden Luftströme am Punkt ihres Zusammentreffens zu achten.

Die im modifizierten Glastunneltest erhaltenen Ergebnisse bestätigten die Unzulänglichkeit einer ohne Luftströmungen arbeitenden Anordnung; insbesondere zeigten die Tiere keinerlei gerichtetes Orientierungsverhalten. Auch das Y-Olfaktometer mit einem duftstoffhaltigen und einem gleich starken "leeren" Luftstrom erwies sich trotz guter Ansätze auf Grund der schlechten Reproduzierbarkeit der Testresultate als unbefriedigend. Dies wurde auf klar nachweisbare Luftverwirbelungen (s.IV.2.3) am Kreuzungspunkt des Y zurückgeführt, die den Larven eine klare Unterscheidung der beiden Luftströme unmöglich machten; dieses Phänomen ist auch aus der Literatur bekannt (Visser [65]).

Nach der Beseitigung dieses Problempunkts durch die Einführung eines zentralen, dritten Strömungsweges in der Dreizack-Anordnung erfüllte dieser Testaufbau alle o.g. Anforderungen. Der Dreizack-Test erlaubte die Untersuchung der

Reaktion von *H. armigera* - Larven auf beliebige flüchtige Stoffe unter Ausschluß möglicher Einflüsse durch andere Stimuli. Da er, wie die klassischen Y-Olfaktometer, eine geruchliche Orientierung der Larven gegen die Luftströmung voraussetzte, war er von vornherein mehr auf die Identifizierung attraktiver Stoffe ausgelegt als auf die Entdeckung repellerender Substanzen (Dicke [91]). Der Dreizack-Test erwies sich in den zahlreichen durchgeführten Testreihen als sehr zuverlässig und lieferte gut reproduzierbare Ergebnisse.

1.2 Testtiere

Vorversuche zur Optimierung der *H. armigera* - Laborzucht belegten, daß nur die Einzelhaltung der Larven eine befriedigende Entwicklung gewährleistete (s.IV.1.1). Dagegen konnte bei der gemeinsamen Aufzucht mehrerer Larven auf einer Portion Diät das Phänomen des Kannibalismus bestätigt werden, das in der Literatur für *Heliothis*-Larven auch bei einem Überangebot an Nahrung und sogar unter natürlichen Bedingungen im Feld beschrieben ist (Joyner und Gould [92], Jayaraj [19]). Wegen des Kannibalismus empfahl auch Hardwick [18] eine isolierte Aufzucht von *Heliothis*-Larven.

Beim Vergleich der Entwicklungsdaten für *H. armigera* in unserer Laborzucht mit den entsprechenden Literaturdaten (Hill [15], Jayaraj [19], Doss [93]) für die Entwicklung unter natürlichen Bedingungen ergab sich eine gute Übereinstimmung hinsichtlich der Generationszeit, der Dauer des Ei- und Puppenstadiums und des Puppengewichtes. Lediglich die Dauer des Larvenstadiums lag in unserer Zucht mit 14 Tagen an der unteren Grenze des von den meisten Autoren genannten "normalen" Bereichs (z.B. bei Hill [15] : 14-24 Tage), und die Zahl der Larvenstadien war auf 5 reduziert (vgl.IV.1.2).

Beide Größen hängen jedoch stark von äußeren Faktoren (Temperatur, Feuchtigkeit, Wirtspflanze) ab : so wurden als Extremwerte für die Dauer der Larvenentwicklung 8 bzw. 51 Tage registriert (Jayaraj [19]); die Zahl der beobachteten Larvenstadien beträgt normalerweise 6 (Jayaraj [19]), schwankt jedoch je nach Umweltbedingungen zwischen 5 und 7 (Hardwick [18]). Nachiappan und Subramaniam [94] berichten ebenfalls über eine Reduktion der Stadienzahl auf einer halbkünstlichen Diät.

Die in unserer Laborzucht gefundenen Werte bestätigten somit, daß die angebotene Larvendiat und die gewählten Zuchtbedingungen (27° C, 80% relative Luftfeuchtigkeit) nahe am Optimum lagen (nach Jayaraj [19] : 25-28° C, 80-100% r.L.) und lassen auf eine ausgezeichnete Qualität der Labortiere schließen.

Für die Verhaltenstests wurden Larven zweier verschiedener Entwicklungsstufen verwendet : frisch geschlüpfte L₁ und L₅ kurz nach der L₄/L₅-Häutung.

Die als Testtiere gewählten L_1 wurden vom Schlüpfen bis zum Einsatz im Test ohne Nahrung gehalten und die L_2 vor dem Test einer mehrstündigen Hungerphase unterzogen, um so die Aktivität und "Entscheidungsbereitschaft" der Versuchstiere im Sinne des Modells von Miller und Strickler [37] (s. Abb. 3) zu erhöhen. Im Gegensatz dazu stand allen Larven vor dem Test Wasser in ausreichendem Maß zur Verfügung, um ihre Sensitivität gegenüber Feuchtigkeit in analoger Weise zu senken. Die Notwendigkeit und die Effektivität einer solchen Verfahrensweise waren von Saxena [41] nachgewiesen worden. Bei den L_1 diente darüber hinaus noch die aus der Literatur (Griswold und Trumble [95]) auch für die frühen Stadien anderer Noctuiden-Larven bekannte photopositive Reaktion zur Abtrennung besonders aktiver Tiere (vgl. IV.1.2).

Die L_1 , die in der Laborzucht bei minimalem Arbeitsaufwand in großer Zahl zur Verfügung standen, konnten in Gruppen zu 5 Tieren getestet werden. Dies erlaubte die Durchführung von Versuchen mit vielen Individuen in relativ kurzer Zeit. Da die L_1 zudem vor dem Test keinerlei Kontakt zu Nahrungsquellen hatten, also mit Sicherheit nicht geprägt waren (s.u.), eigneten sie sich hervorragend als Standard-Versuchstiere für die Routinetests.

Die Aufzucht der L_2 auf der Kichererbsen-Diät war dagegen mit erheblichem Arbeitsaufwand verbunden und verursachte möglicherweise eine Prägung der Tiere auf diese Nahrung (s.u.). Die L_2 wurden individuell getestet; dies ermöglichte einerseits eine genauere Beobachtung ihres Verhaltens und schloß eine gegenseitige Beeinflussung der Tiere aus, bedingte aber andererseits einen hohen Zeitaufwand. Die L_2 kamen daher in den Versuchen zum Einsatz, in denen die Entwicklung bzw. Überprüfung der Testmethode im Vordergrund stand.

2. Attraktivität des Gesamtaromas gemahlener *C. arietinum* - Samen für *H. armigera* - Larven

In den Versuchen zur Erarbeitung der Biotest-Methode erschien eine Geruchsquelle vorteilhaft, die für die gut zu studierenden L_2 mit hoher Wahrscheinlichkeit attraktiv war, um bei gegebener Attraktivität dieser Duftquelle die verschiedenen Testparameter optimieren zu können. Daher wurden zu Beginn Kichererbsenmehl als Geruchsquelle und auf Kichererbsen-Diät gezogene L_2 als Versuchstiere eingesetzt, um bewußt eine mögliche Prägung der Tiere auf diese Nahrung auszunützen.

Unter "Prägung" ("induction") versteht man in diesem Zusammenhang den Vorgang, der nach der mindestens 24-stündigen Aufnahme einer bestimmten Nahrung bei dem betreffenden Insekt eine Präferenz für diese Nahrung gegenüber vorher gleichwertigen oder bevorzugten Futtersorten bewirkt (Dethier [35]); es handelt sich um eine durch Erfahrung bedingte, reversible Änderung des Verhaltens (Papaj und Prokopy [96]).

Das Phänomen der Prägung wurde erstmals 1968 von Jermy et.al. [97] an Raupen der Spezies *Manduca sexta* und *Heliothis zea* beobachtet und seither für eine Reihe von Insekten, vor allem Lepidopteren-Larven bestätigt (de Boer und Hanson [98]). Bei der Suche nach den Mechanismen, die der Prägung zugrunde liegen, zeigten elektrophysiologische Untersuchungen, daß die Sensitivität der Chemorezeptoren von Schmetterlingsraupen deutlich variierte, je nachdem, auf welcher Nahrung die Tiere aufgezogen worden waren (Schoonhoven [99], Blaney et.al. [100]).

Durch Amputationsexperimente wiesen Hanson und Dethier [101] nach, daß sowohl die Geschmacks-, als auch die Geruchsorgane der Larven zu den beobachteten Prägungseffekten beitrugen. Diese Befunde wurden schließlich durch Saxena und Schoonhoven [102,103] bestätigt, die zeigen konnten, daß neben dem Fraßverhalten der Larven auch deren Orientierungsverhalten durch eine Prägung eindeutig verändert wurde.

Eine Prägung induziert somit im Orientierungsverhalten der Raupen eine Präferenz für flüchtige Geruchsstoffe der betreffenden Nahrung und muß daher nicht nur in Fraßversuchen, sondern auch bei Verhaltenstests ohne direkten Kontakt zur Nahrungs-(Geruchs-)quelle Berücksichtigung finden.

Bei den auf Kichererbsen gezogenen *H. armigera*-L₅ konnte in mehreren Testreihen mit der Dreizack-Anordnung eine signifikante Attraktivität des Gesamtaromas gemahlener *C. arietinum*-Samen nachgewiesen werden. Dies galt sowohl bei der Verwendung von Kichererbsenmehl selbst als Geruchsquelle (Testreihen II bis IV, s.IV.3.2), als auch für das an Tenax adsorbierte Kichererbsen - Gesamtaroma (Testreihe V, s.IV.3.3).

Anschließend wurde das Verhalten von L₅, die auf einer Luzerne/Soja-Diät gezogen worden waren, und von frisch geschlüpften L₁ gegenüber dem an Tenax adsorbierten *C. arietinum*-Gesamtaroma getestet. Auch für diese beiden Gruppen von Versuchstieren, die sicher nicht auf Kichererbsen geprägt waren, erwies sich das Kichererbsen-Gesamtaroma als signifikant attraktiv (Testreihen VI und VIII, s.IV.3.4). Ob dabei die etwas niedrigeren Präferenzwerte für die L₅ des Luzerne/Soja-Stamms bzw. die L₁ gegenüber den L₅ aus der normalen Laborzucht durch einen Prägungseffekt bedingt oder zufällig waren, wurde nicht näher untersucht.

Die von Saxena und Rembold [48] mit Hilfe des Glastunneltests gefundene Attraktivität des Kichererbsen-Aromas konnte somit in einer verbesserten Testanordnung, die nunmehr den Einfluß optischer Reize ausschloß, bestätigt werden. Nachdem sich das *C. arietinum*-Aroma unabhängig von einem möglichen Prägungseffekt als äußerst attraktiv für *H. armigera*-Larven erwiesen hatte, erschien eine umfassende chemische Analyse dieses Aromas lohnend.

3. Analytische Methodik

In seinem Übersichtsartikel unterscheidet Weurman [104] zwei verschiedene Ansätze der Aromauntersuchung: die möglichst vollständige Analyse aller in dem zu prüfenden Material enthaltenen flüchtigen Stoffe ("total volatile analysis") und die direkte Analyse der tatsächlich in den Gasraum über diesem Material emittierten Geruchsstoffe ("headspace vapor analysis"). Die eigentliche Analyse erfolgt dabei meist mit Hilfe der Gaschromatographie nach geeigneter Aufarbeitung der Probe; für die "vollständige Aromaerfassung" sind dies z.B. die Verfahren der Extraktion, der (Wasserdampf-)Destillation oder der kontinuierlichen Destillation/Extraktion, je nach der Natur der betreffenden Probe.

3.1 Headspace - Untersuchung

Bei der Untersuchung flüchtiger Stoffe mit dem Ziel, biologisch aktive Komponenten zu identifizieren, wird jedoch der Headspace-Analyse mehr und mehr der Vorzug gegeben. Entscheidend ist unter diesem Aspekt ja nicht, welche flüchtigen Stoffe in dem untersuchten Material generell enthalten sind, das Interesse gilt vielmehr der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der flüchtigen Verbindungen in der Form, in der sie den betreffenden Organismus erreichen und ihre biologische Aktivität entfalten.

So ist es z.B. bei der Isolierung und Identifizierung von Sexualpheromonen heute üblich, neben einem Lösungsmittel-extrakt der jeweiligen Pheromondrüse auch die tatsächlich in die Luft abgegebenen Stoffe durch eine Headspace-Analyse zu untersuchen (Pope et.al. [105]). Dabei wurde festgestellt, daß die quantitative Zusammensetzung der flüchtigen Verbindungen im Drüsenextrakt teilweise erheblich von der im emittierten Duftstoffgemisch abweicht und daß manche Drüseninhaltsstoffe überhaupt nicht in der Umgebungsluft nachweisbar sind (Brand [106], Tumlinson et.al. [107]).

Ähnliches gilt auch für die Analytik von Pflanzeninhaltsstoffen mit einer möglichen attraktiven Wirkung auf Insekten: bei einer Reihe von Pflanzen (z.B. Baumwolle, Hafer, Sonnenblume) erbrachte der Vergleich von Headspace-Analysen einerseits und klassischen Methoden der "vollständigen Aromaanalyse" wie der (Vakuum-)Wasserdampfdistillation andererseits signifikant unterschiedliche Ergebnisse (Hedin [108], Buttery et.al. [109], Etievant et.al. [110]). Nur die von der Pflanze in die Umgebungsluft emittierten Stoffe jedoch bestimmen über einige Entfernung hinweg den Geruchseindruck des Insekts und sind damit in der Lage, dessen Orientierungsverhalten zu beeinflussen; um die Rolle flüchtiger Pflanzeninhaltsstoffe in der Pflanze/Insekt-Wechselwirkung zu studieren, ist daher die Headspace-Analyse die Methode der Wahl (Finch [83], Buttery und Ling [111], Buttery et.al. [112]).

Im vorliegenden Fall war es das Ziel der analytischen Untersuchungen, die qualitative und quantitative Zusammensetzung des von Kichererbsenmehl abgegebenen Gesamtaromas zu bestimmen, das im Verhaltenstest auf *H. armigera*-Larven attraktiv wirkte. Auch hierfür erschien aus den o.g. Gründen eine gaschromatographische Analyse der im Gasraum (Headspace) über gemahlene *C. arietinum*-Samen enthaltenen Verbindungen als optimale Methode.

3.2 Anreicherung flüchtiger Verbindungen aus dem Headspace

Eine direkte Injektion des Headspace-Gases in den GC scheidet dabei im Normalfall aus, weil die Konzentration der enthaltenen Verbindungen i.a. so niedrig liegt, daß mit dieser Methode höchstens die mengenmäßig vorherrschenden Komponenten mit hohen Dampfdrücken erfaßt werden können. Eine Erhöhung des Headspace-Probenvolumens aber hat nicht akzeptable Bandenverbreiterungen und eine schlechte Auflösung im Gaschromatogramm zur Folge (Jennings und Filsoof [113]).

Von den mit der letztlich angewandten Methode im Kichererbsen-Gesamtaroma erfaßten 200 Verbindungen hätten, unter der Annahme einer Nachweisgrenze für die flüchtigen Stoffe von etwa 0.1 mg/m^3 im Probenahmegas (Schaefer [114]), durch direkte Headspace-Injektion nur 4 Substanzen detektiert werden können.

Vor der GC-Analyse ist daher eine Anreicherung der in der Gasphase in sehr verdünnter Form vorliegenden organischen Stoffe notwendig; aus der Literatur sind hierfür vor allem folgende Verfahren bekannt: Absorption in Flüssigkeiten, Kondensation in Kühlfallen und Adsorption an Feststoffen (Schaefer [114]).

Bei der Anreicherung aus wasserhaltigen Proben (Kichererbsenmehl: ca. 8% Wasser) findet sich in den Kühlfallen-Konzentraten stets Wasser als Hauptbestandteil, der die weitere GC-Analyse erheblich stören und die Trennsäule beschädigen kann (Jennings und Filsoof [113]). Daher wird diese Methode ebenso selten benutzt wie die auf Grund der ungenügenden Empfindlichkeit (hohe Verdünnung) unbefriedigende Absorption in Lösungsmitteln (Brown und Purnell [115]).

Dagegen wird die Adsorption an Feststoffe häufig angewandt. Hierzu leitet man den Gasstrom über ein mit einem geeigneten Adsorbens gefülltes Röhrchen, wobei die im Gas enthaltenen organischen Verbindungen auf dem Adsorbens festgehalten und angereichert werden. Die kritischen Punkte derartiger Verfahren liegen in den Forderungen nach einer quantitativen Adsorption der Probenkomponenten aus dem Gas einerseits und nach einer anschließenden, quantitativen Freisetzung der adsorbierten Stoffe zur GC-Analyse andererseits.

So zeichnet sich die früher häufig eingesetzte Aktivkohle zwar durch eine extrem hohe Adsorptionskapazität aus, jedoch ist eine quantitative Wiedergewinnung der adsorbierten

Stoffe auf Grund der festen Bindung unter vernünftigen Bedingungen kaum erreichbar. Hinzu kommen mögliche chemische Veränderungen labiler Verbindungen während der Adsorption auf der Aktivkohle (Schaefer [114]).

3.3 Adsorption an porösen Polymeren

Die Aktivkohle wird heute durch verschiedene poröse Polymere ersetzt, weil diese einen berechenbaren und kontrollierten Ablauf des Adsorptions- und Desorptionsprozesses gewährleisten (Schaefer [114]). In mehreren Arbeiten werden die Eigenschaften von porösen Polymeren und deren Eignung als Adsorptionsmittel ausführlich diskutiert (Brown und Purnell [115], Butler und Burke [66], Schaefer [114], Sydor und Pietrzyk [116]).

Danach liegt der Anreicherung flüchtiger Verbindungen auf porösen Polymeren ein reiner Adsorptionsmechanismus unter Ausbildung einer einmolekularen Oberflächenschicht zugrunde; die beobachteten Adsorptionsisothermen sind für die in der Praxis interessierenden Stoffkonzentrationen im Probegas linear.

Ein mit einem porösen Polymer gefülltes Adsorptionsröhrchen kann als kurze, gaschromatographische Säule aufgefaßt werden. Die Durchbruchvolumina der flüchtigen Stoffe sind dabei innerhalb gewisser Grenzen unabhängig von der Konzentration der betreffenden Verbindung im Probegas, jedoch sehr stark abhängig von der Temperatur. Abb. 50 zeigt diese Abhängigkeit; aufgetragen ist dabei der Logarithmus der entsprechenden Retentionsvolumina V_R gegen die reziproke absolute Temperatur T für einige n-Alkane auf einem Tenax-Adsorptionsröhrchen.

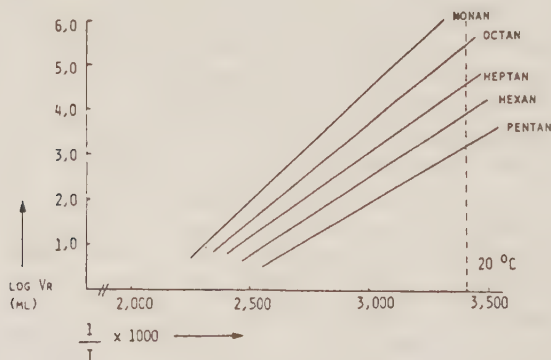


Abb. 50: Adsorptionsverhalten einiger n-Alkane auf einem Tenaxröhrchen in Abhängigkeit von der Temperatur: Logarithmus der Retentionsvolumina V_R [ml] gegen $1000/T$ [° K]. Nach Schaefer [114].

Abb. 50 verdeutlicht, daß die Adsorptionskapazität des Röhrchens für Verbindungen innerhalb einer homologen Reihe mit wachsender Kettenlänge zunimmt. Allgemein ist das Durchbruchvolumen umso größer, je höher der Siedepunkt des betreffenden Stoffs liegt, wobei allerdings polare Verbindungen (Alkohole, Säuren, Amine) deutlich schwächer retiniert werden als unpolare (Kohlenwasserstoffe etc.).

Weitere in der Praxis entscheidende Vorteile bei der Verwendung von porösen Polymeren liegen in deren extrem niedriger Affinität zu Wasser und der weitgehenden Unabhängigkeit ihrer Adsorptionskapazität vom Wassergehalt des Probenahme-gases (bis 92% relative Luftfeuchtigkeit), vom Gasfluß (im Bereich von 5 bis 600 ml/min) und von der Teilchengröße des Adsorbens (im Bereich der handelsüblichen Größen) (Brown und Purnell [115], Sydor und Pietrzyk [116]).

3.4 Auswahl des Adsorbens und der Desorptionsmethode

Schaefer [114], Butler und Burke [66] u.a. betonen, daß ein optimales Adsorbens nicht existiert; vielmehr muß die Auswahl des Adsorptionsmittels auf die spezifischen Anforderungen des untersuchten Problems abgestimmt werden.

Die beiden gebräuchlichsten porösen Polymere sind Porapak Q und Tenax. In Tab. 35 sind die chemische Struktur und einige physikalische Eigenschaften dieser Adsorbentien aufgeführt.

Tab. 35: Chemische Struktur und einige physikalische Eigenschaften von Porapak Q und Tenax (nach Poole und Schütte [69])

	Porapak Q	Tenax
chemische Struktur :	Kopolymer aus Ethylvinylbenzol + Divinylbenzol	Polymer aus 2,6-Diphenyl- p-phenylenoxid
thermisch stabil bis :	250° C	375° C
spezifische Oberfläche:	500-700 m ² /g	19 m ² /g
Dichte im freien Fall :	0.35 g/cm ³	0.37 g/cm ³

Da die Adsorptionskraft eines Polymers hauptsächlich von seiner spezifischen Oberfläche bestimmt wird, verfügt Porapak Q über eine wesentlich höhere Adsorptionskapazität als Tenax (vgl. Tab. 35). Abb. 51 zeigt dies in der oben erläuterten Darstellungsweise am Beispiel des Acetonitrils. Bei analytischen Problemstellungen, bei denen die Adsorptionskapazität der limitierende Faktor ist, wird daher meist Porapak Q als Adsorbens bevorzugt.

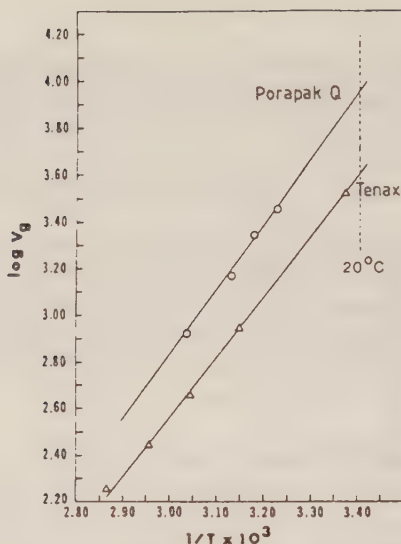


Abb. 51: Adsorptionskapazitäten von Tenax und Porapak Q für Acetonitril. Logarithmus der spezifischen Retentionsvolumina V_R [ml/g] gegen $1000/T$ [°K]. Nach Butler und Burke [66].

Da jedoch bei der Adsorption der flüchtigen Verbindungen aus dem Headspace über gemahlene *C. arietinum*-Samen nur ein Probenahmevolumen von 1.5 l benötigt wurde, erwies sich die Adsorptionskraft der Tenax-Röhrchen für unsere Zwecke als ausreichend. In sehr guter Übereinstimmung mit Literaturangaben über Durchbruchvolumina unter ähnlichen Probenahmebedingungen (Brown und Purnell [115]) konnte nur für extrem leichtflüchtige Substanzen wie Ethanol, n-Pentan oder Aceton ein Substanzdurchbruch beobachtet werden (vgl. IV.5.5).

Die Adsorptionskapazität war im vorliegenden Fall somit nicht das ausschlaggebende Kriterium für die Auswahl des Adsorbens; vielmehr traten andere Eigenschaften in den Vordergrund.

Zur Wiedergewinnung der auf dem Polymer adsorbierten Substanzen stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Bei der Elution mit Lösungsmitteln müssen die Anwesenheit eines dominierenden Lösungsmittelpeaks im Gaschromatogramm und ein drastischer Verdünnungseffekt durch das Lösungsmittel in Kauf genommen werden. Der Empfindlichkeitsverlust durch den Verdünnungseffekt ist dann akzeptabel, wenn er durch eine erhöhte Sensitivität an anderer Stelle ausgeglichen werden kann, wie etwa durch die Verwendung eines ECD-Detektors bei der Analyse chlorierter Kohlenwasserstoffe (Brown und Purnell [115]).

Ansonsten ist die thermische Desorption einer Lösungsmittel-elution vorzuziehen (Cole [117]). Die thermische Desorption mit anschließender splitloser Überführung der desorbierten Substanzen auf die Kapillartrennsäule des Gaschromatographen steigert die Empfindlichkeit im Vergleich zu einer Lösungsmitteldesorption mit nachfolgender splitloser Injektion des Eluats um den Faktor 500 bis 1000 (Nitz et.al. [61]). Darüber hinaus vermeidet das lösungsmittelfreie Arbeiten bei der thermischen Desorption die Probleme einer Überlappung leichtflüchtiger Substanzen durch den Lösungsmittelpeak im Gaschromatogramm ebenso wie Schwierigkeiten durch Verunreinigungen im Lösungsmittel (Hedin [108]).

Bei der thermischen Desorption ist Tenax auf Grund seiner außergewöhnlichen thermischen Stabilität (vgl. Tab.35) allen anderen Polymeren weit überlegen. Diese Stabilität vermeidet ein "Bluten" des Tenax während der thermischen Desorption und führt zu sauberen Blindchromatogrammen ohne Störpeaks. Im Gegensatz dazu stellen "Blindpeaks" bei der Verwendung von Porapak Q selbst nach sorgfältiger Vorreinigung sowohl bei der thermischen Desorption als auch bei der Elution mit Lösungsmitteln (Schaefer [114]) ein erhebliches Problem dar.

Im konkreten Fall der Analyse des Gesamtaromas gemahlener *C. arietinum*-Samen wurden sowohl Versuche mit einer Headspace-Adsorption an Porapak Q und anschließender Elution mit Ether (s. IV.4.3), als auch Headspace-Adsorptionen an Tenax mit nachfolgender thermischer Desorption (s. IV.5.4) durchgeführt. Dabei konnte die wesentlich höhere Empfindlichkeit der thermischen Desorptionsmethode ebenso bestätigt werden wie die ausgezeichnete Qualität der mit Tenax erhaltenen Blindchromatogramme; dagegen produzierte Porapak Q eine Reihe von Störpeaks.

Aus diesen Gründen fand im vorliegenden Fall für alle weiteren Untersuchungen die Headspace-Adsorption an Tenax mit anschließender thermischer Desorption als Standardmethode Verwendung.

3.5 Gaschromatographie

Das Problem der splitlosen Überführung der thermisch desorbierten Verbindungen von dem Tenax-Adsorptionsröhrchen auf die Kapillarsäule des GC wurde durch eine Zwischenanreicherung der Stoffe in einem PTV-Injektor auf einem gekühlten Vorsäulchen gelöst (Nitz et.al. [61], Wächter et.al. [62]).

Die Anordnung dieses Vorsäulchens vor der Splitstelle für das Trägergas erlaubte es, während der thermischen Desorption bei geöffnetem Split-Ventil einen ausreichend hohen Gasfluß (ca. 20 ml/min) zu erzielen, um die Desorptionsdauer kurz zu halten (10 min) und dennoch die desorbierten Stoffe in dem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Vorsäulchen quantitativ aufzufangen.

Durch schnelles Aufheizen des PTV-Injektors ließen sich dann, bei geschlossenem Split-Ventil und normalem Trägergasfluß (1-2 ml/min), die flüchtigen Verbindungen splitlos vom Vorsäulchen auf die Kapillarsäule überführen. Um eine zusätzliche Fokussierung der Probenkomponenten auf der Trennsäule zu erreichen, wurde der GC-Ofen zum Beginn der eigentlichen Analyse auf 0° C abgekühlt.

Da zu erwarten war, daß es sich bei dem *C. arietinum*-Gesamtaroma um ein komplexes Gemisch von Verbindungen stark unterschiedlicher Polarität und Flüchtigkeit handeln würde, bot sich für die Auftrennung eine Kapillarsäule mit einer universell verwendbaren flüssigen Phase mittlerer Polarität (SE 54) an. Dem durch die Art der Probenahme bedingten hohen Anteil leichtflüchtiger Stoffe sollte dabei durch eine erhöhte Filmdicke (1.2 µm) Rechnung getragen werden (Johansen [118]).

3.6 Überprüfung der analytischen Methode

Die erstellte analytische Standardmethode zur Untersuchung des *C. arietinum*-Gesamtaromas, bestehend aus Headspace-Adsorption an Tenax, thermischer Desorption und anschließender GC-Analyse, erwies sich nach eingehender Überprüfung (s. IV.5) unter allen qualitativen und quantitativen Aspekten als zuverlässig und leistungsfähig. Das Verfahren zeichnete sich besonders durch eine einfache und rasche Handhabung sowie durch eine hohe Empfindlichkeit aus.

4. Qualitative und quantitative Analyse des Gesamtaromas gemahlener *Cicer arietinum* - Samen

4.1 Vorgehen bei der qualitativen Analyse

Zur Identifizierung möglichst vieler Komponenten des Gesamtaromas gemahlener *C. arietinum*-Samen wurden, nach der üblichen Headspace-Adsorption, die entsprechenden Tenaxröhrchen einer thermischen Desorption mit anschließender GC/MS-Analyse unterzogen (s. IV.6.1). Beim Vergleich der dabei erhaltenen Massenspektren der einzelnen Verbindungen mit den Massenspektren bekannter Substanzen in einer Spektrenbibliothek ergaben sich in 154 Fällen hervorragende Übereinstimmungen. Die daraus resultierenden 154 Strukturvorschläge sind in Tab. 26, S. 78 aufgeführt.

Sofern entsprechende Referenzsubstanzen zur Verfügung standen, erfolgte eine Absicherung dieser Strukturvorschläge durch Co-Chromatographie (s. IV.6.2). 82 Komponenten des *C. arietinum*-Gesamtaromas ließen sich auf diese Weise zweifelsfrei identifizieren (vgl. Tab. 26).

Diese 82 Stoffe repräsentierten zusammen 84% der Gesamtfläche aller registrierten Peaks; unter ihnen befanden sich bis auf 2 Ausnahmen (vgl. IV.6.6) alle Peaks mit einem Flächenanteil von mehr als 0.5%.

Eine weitere Möglichkeit, die auf den Massenspektren basierenden Strukturvorschläge zu überprüfen, bestand im Vergleich der Kovats-Indices der betreffenden Verbindungen mit entsprechenden Literaturwerten (s. IV.6.3).

In dem von Kovats 1958 zur Standardisierung und besseren Vergleichbarkeit von Retentionsdaten eingeführten Indexsystem (Kovats [77]) gibt man das Retentionsverhalten einer Substanz relativ zur Retention einer homologen Reihe von Standardsubstanzen, meist der n-Alkane, an. Zur Berechnung der Indices I aus den in isothermer Arbeitsweise ermittelten Netto-retentionszeiten muß logarithmisch interpoliert werden:

$$I = 100 \times \frac{\log t_{S(X)} - \log t_{S(Z)}}{\log t_{S(Z+1)} - \log t_{S(Z)}} + 100 \times Z$$

wobei : $t_{S(X)}$, $t_{S(Z)}$, $t_{S(Z+1)}$ = Netto-retentionszeiten der untersuchten Verbindung X und der 2 benachbarten n-Alkane mit Z bzw. Z+1 C-Atomen

Bei der Analyse komplexer Gemische von Stoffen mit einem großen Siedepunktsbereich müssen zur Bestimmung der klassischen Kovats-Indices mehrere isotherme GC-Läufe durchgeführt werden; ferner ist wegen der Benützung der Netto-retentions-

zeiten t_s die Bestimmung der Totzeit t_0 für jede benutzte Ofentemperatur erforderlich.

Diese Nachteile entfallen bei linear temperaturprogrammierter Arbeitsweise, für die das Retentionsindexsystem in modifizierter Weise anzuwenden ist (van den Dool und Kratz [70]) :

$$I = 100 \times \frac{t_{R(x)} - t_{R(z)}}{t_{R(z+1)} - t_{R(z)}} + 100 \times Z$$

wobei: $t_{R(x)}$, $t_{R(z)}$, $t_{R(z+1)}$ = Gesamtretentionszeiten (s.o.)

Alle Retentionsdaten können jetzt in einem GC-Lauf ermittelt werden; die logarithmische Interpolation und die Bestimmung der Totzeit sind nicht mehr notwendig.

Daher wurden zur Identifizierung im vorliegenden Fall die Indices verwendet, die sich aus den Retentionswerten der linear temperaturprogrammierten GC/MS-Analyse nach der modifizierten Formel errechneten. Beim Vergleich mit entsprechenden Literaturdaten genügte dabei innerhalb einer Substanzklasse oft die Festlegung einer bestimmten Elutionsreihenfolge (vgl. IV.6.3).

Über die Kovats-Indices konnten so weitere 43 Strukturvorschläge abgesichert werden.

4.2 Ergebnisse der qualitativen Analyse

Es ist hier nicht möglich, alle 154 im *C. arietinum*-Gesamtaroma identifizierten Verbindungen (vgl. Tab. 26) hinsichtlich ihrer Herkunft, möglichen Biosynthese und sonstigen Verbreitung in Pflanzen etc. zu diskutieren. Zwei Aspekte der Ergebnisse aus der qualitativen Analyse sollen jedoch näher erörtert werden : die Möglichkeit der Veränderung von Substanzen durch enzymatische Reaktionen und das Auftreten zahlreicher aliphatischer, nicht terpenoider Kohlenwasserstoffe.

Enzymatische Reaktionen

Bei der Zerstörung pflanzlicher Zellen in Gegenwart von Sauerstoff, z.B. beim Zerkleinern vieler Blätter und Früchte, kommt es häufig zur enzymatisch katalysierten Bildung flüchtiger Aldehyde und Alkohole mit einer Kettenlänge von 6 C-Atomen (u.a.); die Hauptprodukte, cis-3-Hexenal, trans-2-Hexenal ("leaf aldehyde"), n-Hexanal und die korrespondierenden Alkohole cis-3-Hexen-1-ol ("leaf alcohol"), trans-2-Hexen-1-ol und Hexan-1-ol, tragen wesentlich zum sog. "grünen" Aroma etwa von Blättern bei (Hatanaka et.al. [119], Sekiya et.al. [120]).

Ausgangsstoffe für diese Abbaureaktionen sind dabei aus Fetten freigesetzte C_{18} -Fettsäuren mit einem cis-1,cis-4-Pentadien-System (Linolsäure, Linolensäure). Die Reaktion

verläuft in Gegenwart von Sauerstoff unter Mitwirkung der Enzyme Lipoxygenase, Hydroperoxidlyase, einer Isomerase und Alkoholdehydrogenase über die Hydroperoxide zu den o.g. Aldehyden bzw. Alkoholen (Belitz und Grosch [1], Schreier und Mosandl [121]).

Lipoxygenasen kommen in den Leguminosen allgemein in relativ hohen Mengen vor, besonders reichlich in Sojabohnen (Schormüller [122]). Auch für Kichererbsen wurde eine deutliche Lipoxygenaseaktivität beschrieben (Sosulski und Gadan [123]) und in jüngster Zeit konnte das Enzym aus dieser Pflanze auch isoliert und näher charakterisiert werden (Borthakur et.al. [124]).

C. arietinum-Samen enthalten etwa 5% Fett (vgl. Tab.1), in dessen Fettsäurezusammensetzung Myristin- (10.2%), Palmitin- (10.9%), Öl- (27.1%), Linol- (38.2%) und Linolensäure (4.3%) mengenmäßig dominieren (Werte für Kichererbsen italienischer Herkunft nach Ghirardi et.al. [125]). Auch die potentiellen Substrate der Lipoxygenase sind somit reichlich vorhanden.

In Langzeitversuchen über die Lagerstabilität von Kichererbsenmehl erwies sich dabei der Wassergehalt des Mehls als entscheidender Faktor für die Entfaltung der Enzymaktivität: die Entwicklung eines wahrnehmbaren sog. "off-flavours", das auf die enzymatische Oxidation von Fetten und Carotinoiden zurückgeführt wird, konnte bei einer Versuchsdauer von 24 Wochen erst ab einem Wassergehalt von 14% beobachtet werden (Arya [126]).

Zwar lag der Wassergehalt der untersuchten Kichererbsenmehle im vorliegenden Fall bei nur ca. 8%, jedoch kam das Mehl während des Temperierens bei 43° C für 10 min in Kontakt mit dem Luftsauerstoff im Adsorptionskolben. Als Indikator für die somit denkbaren enzymatischen Abbaureaktionen während der Probenahme konnte das Auftreten der o.g. flüchtigen C₆-Körper dienen.

Dabei ergab sich kein einheitliches Bild: während cis-3- und trans-2-Hexen-1-ol und cis-3-Hexenal überhaupt nicht nachgewiesen werden konnten und trans-2-Hexenal und Hexenal nur in sehr geringen Mengen vorlagen (2 bzw. 8 ng pro Standardprobenahme), fanden sich erhebliche Mengen Hexanol (163 ng).

Enzymatische Reaktionen vom oben geschilderten Typ können zwar auf Grund dieser Ergebnisse nicht völlig ausgeschlossen werden, offensichtlich aber spielen sie zumindest nicht eine so dominierende Rolle wie etwa bei der Aufarbeitung von Blättern: selbst bei der Untersuchung ganzer, intakter Blätter bilden die flüchtigen C₆-Verbindungen und ihre Derivate (z.B. Ester) oft die mengenmäßig vorherrschenden Komponenten, so z.B. bei Weizen (Buttery et.al. [112]). Dieser Effekt ist bei der Aufarbeitung mazerierter Blätter noch viel stärker ausgeprägt (Buttery und Kamm [127]).

Aliphatische Kohlenwasserstoffe

Am Ergebnis der qualitativen Analyse des *C. arietinum*-Gesamtaromas fiel die große Zahl der identifizierten geradkettigen und methylverzweigten, nicht terpenoiden Kohlenwasserstoffe auf.

Aus der Literatur sind zahlreiche Beispiele für Untersuchungen von Pflanzeninhaltsstoffen bekannt, in denen vergleichbare aliphatische Kohlenwasserstoffe gefunden wurden. So geht aus einer Literaturübersicht über flüchtige Lebensmittelinhaltsstoffe (van Straten und Maarse [49]) hervor, daß z.B. n-Tridecan in Weintrauben, Erbsen, Citrusfrüchten, Petersilie, Dill, Kokos- und Walnüssen, Hopfen u.a. beschrieben wurde; für Erbsen wurde das Auftreten von Un-, Do-, Tri-, Tetra- und Pentadecan berichtet, in Sojabohnen das Vorkommen von Pentan, Decan und 3-Methyldecan usw..

Bei der Diskussion dieser Ergebnisse stufen die meisten Autoren derartige Kohlenwasserstoffe ohne nähere Untersuchungen über deren mögliche Herkunft als Artefakte bzw. Verunreinigungen aus der Probenahme oder der Aufarbeitung ein. Im Gegensatz dazu betonen Tressl et.al. [128], die bei der Untersuchung des Erdbeer-Aromas alle n-Alkane von n-Hexan bis n-Dodecan und zusätzlich 12 methylverzweigte Alkane mit 7 bis 11 C-Atomen fanden, ausdrücklich, daß es sich bei diesen Verbindungen ihrer Ansicht nach um echte Stoffwechselprodukte handeln dürfte.

Auch im vorliegenden Fall kann die Herkunft der gefundenen Kohlenwasserstoffe nicht mit letzter Sicherheit angegeben werden; es sei jedoch darauf hingewiesen, daß in den Blindanalysen (s.IV.5.3) keinerlei Anzeichen dafür gefunden werden konnten, daß es sich bei den o.g. Kohlenwasserstoffen um Artefakte bzw. Verunreinigungen etwa aus der Probenahmeapparatur, der Laborluft, dem GC-System oder von Lösungsmittelresten handeln könnte.

Zwar liegen von den drei untersuchten indischen *C. arietinum*-Varietäten keine GC/MS-Analysen vor, jedoch stimmen die erhaltenen Gaschromatogramme im vorderen Bereich im Peakmuster qualitativ und quantitativ hervorragend mit dem der Kichererbsen-Standardsorte überein (vgl. Abb. 48); daher ist davon auszugehen, daß die prominenten Peaks bei den Retentionszeiten von n-Heptan, n-Octan und n-Nonan auch die entsprechenden Substanzen repräsentieren.

Unter dieser Annahme läßt das Auftreten der o.g. Kohlenwasserstoffe in allen Chargen der Kichererbsen sowohl des Kabuli-Typs aus dem Mittelmeergebiet, als auch des Desi-Typs aus Indien bei völlig unterschiedlichen Anbau-, Lager- und Transportbedingungen sowie Verpackungen auch eine zufällige Verunreinigung der Kichererbsen mit den betreffenden Kohlenwasserstoffen als extrem unwahrscheinlich erscheinen.

4.3 Quantitative Analyse

Ein Nachteil der angewandten Probenahmemethode, der Headspace-Adsorption an Tenax, liegt darin, daß sie eine quantitative Analyse mit Hilfe eines inneren Standards praktisch nicht zuläßt.

Jedoch konnte gezeigt werden, daß sowohl die ersatzweise durchgeführten Eichmessungen über einen externen Standard, als auch die Headspace-Probenahme von gemahlenden *C. arietinum*-Samen selbst gut reproduzierbar waren (vgl. IV.7.2 und IV.7.1). Über diesen Umweg ließ sich auch eine quantitative Analyse der bei einer Standardprobenahme erfaßten Verbindungen des Kichererbsen-Gesamtaromas mit ausreichender Genauigkeit bewerkstelligen (vgl. IV.7.2).

Dabei ergab sich die Gesamtmenge der erfaßten flüchtigen Stoffe pro Standardprobenahme zu 2.4 µg, mit α-Pinen als mengenmäßig bedeutendster Komponente (298 ng). Nach Stoffklassen geordnet dominierten die Terpenoide und Alkohole mit Mengenanteilen von 35% bzw. 18% (vgl. Tab. 28).

5. Kombination GC-Analytik / Biologischer Test

Die Headspace-Adsorption an Tenax diente nicht nur als optimale Probenahmemethode für die chemische Analytik, sondern erlaubte auch die Untersuchung beliebiger flüchtiger Stoffe im biologischen Test. So konnte ein mit dem Headspace gemahlener *C. arietinum*-Samen oder mit synthetischen Stoffen beladenes Tenax-Adsorptionsröhrchen entweder zur gaschromatographischen Analyse oder, unter milderer Desorptionsbedingungen, als Geruchsquelle im biologischen Test verwendet werden (s. IV.8.1). Die im GC untersuchten Stoffe waren also identisch mit den im Verhaltenstest auf die Larven wirkenden Verbindungen.

Diese direkte Vergleichbarkeit von GC-Analytik und biologischem Test ist bei der Suche nach biologisch aktiven Komponenten in einem komplexen Stoffgemisch von entscheidender Bedeutung. Dies gilt nicht nur unter qualitativen, sondern auch unter quantitativen Gesichtspunkten. Bei den meisten Biotests werden als Geruchsquellen mit einer Lösung der zu untersuchenden Stoffe imprägnierte Filterpapiere, Wattestopfen o.ä. verwendet. Aussagen über die tatsächlich emittierten Mengen der Testsubstanzen sind hier nur schwer möglich.

Im Gegensatz dazu konnte ein als Duftquelle dienendes Tenaxröhrchen zu jedem beliebigen Zeitpunkt des Biotests entfernt werden, um durch GC-Analyse die Menge der verbliebenen Stoffe zu ermitteln; parallel dazu erlaubte die Readsorption auf unbeladenen Tenaxröhrchen in jeder Phase des Biotests die quantitative Bestimmung der tatsächlich freigesetzten Stoffe. Zu einer auf diese Weise erstellten Kinetik der Desorption flüchtiger Verbindungen unter Testbedingungen s. IV.8.1.

6. Ergebnisse der biologischen Tests mit synthetischen Stoffen

In zahlreichen Larventests war die signifikante Attraktivität des an Tenax adsorbierten Gesamtaromas gemahlener *C. arietinum*-Samen für *H. armigera*-Larven nachgewiesen worden (s.o.). Abschließend sollte nun untersucht werden, welche Einzelkomponenten des Gesamtaromas unter den Desorptionsbedingungen des Biotests an der attraktiven Wirkung beteiligt waren.

Dazu wurde der Headspace der zu prüfenden Reinstoffe an Tenax adsorbiert, und die entsprechenden Röhrchen dienten dann als Geruchsquellen im Dreizack-Test mit *L.* als Versuchstieren.

Aus zeitlichen Gründen konnte jedoch nur eine begrenzte Anzahl von Verbindungen im biologischen Test untersucht werden. Eine Literaturübersicht ergab, daß die von 1955 bis 1980 entdeckten, auf Insekten attraktiv wirkenden Stoffe meist aus den Substanzklassen der Terpenoide (31%), Phenole (28%) oder Alkohole (25%) stammten (Smith [129]). Daher legten wir bei der Auswahl der 16 letztlich getesteten Verbindungen den Schwerpunkt auf Vertreter der o.g. Substanzklassen, die im *C. arietinum*-Aroma in größeren Mengen vorlagen (α - und β -Pinen, Myrcen, Δ -3-Caren, Camphen, Limonen, γ -Terpinen, p-Cymol, Butan-1-ol, Pentan-1-ol, Hexan-1-ol). Hinzu kamen Verbindungen mit - zumindest für den Menschen - charakteristischem Geruch (1-Octen-3-on, 1-Octen-3-ol, Benzaldehyd, 2-trans-Heptenal) und n-Octan als Vertreter der Alkane.

Ein Mangel der durchgeführten Biotests besteht darin, daß die optische Aktivität einiger Terpene keine Berücksichtigung fand; d.h. je nachdem, welche Referenzsubstanzen zur Verfügung standen (s. Tab. 3), kamen entweder racemische Gemische oder einzelne Enantiomere zum Einsatz. Alle Substanzen wurden in der gleichen Konzentration getestet, wie sie auch nach einer Standardadsorption aus Kichererbsenmehl vorlagen (s. IV.3.5).

Nur für eine der 16 getesteten Einzelsubstanzen, Pentan-1-ol, konnte im Larventest eine signifikante Attraktivität festgestellt werden (vgl. IV.3.5). Im Gemisch erwiesen sich jedoch auch die drei Terpene Δ -3-Caren, Myrcen und α -Pinen als stark anziehend.

Die höchste Attraktivität erreichte schließlich eine Kombination aus Pentan-1-ol, Δ -3-Caren, Myrcen und α -Pinen im gleichen Mischungsverhältnis wie im *C. arietinum*-Gesamtaroma (nach der Adsorption etwa 2:5:1:9) mit einem Präferenzwert von 34% (Signifikanz: $P < 0.001$ im χ^2 -Test). Die während der 45-minütigen Testdauer tatsächlich aus diesem "Kairomongemisch" freigesetzten Stoffmengen betrugen 43 ng für Pentan-1-ol, 47 ng für Δ -3-Caren, 11 ng für Myrcen und 151 ng für α -Pinen (vgl. Tab. 31).

Vor dem Hintergrund der heutigen Vorstellungen über die Mechanismen, die der Erkennung des Wirtspflanzengeruchs durch ein Insekt zugrunde liegen, überrascht es nicht, daß Mischungen aus verschiedenen Stoffen wesentlich attraktiver wirken als die beteiligten Einzelkomponenten.

Unbestritten ist, daß die Geruchsreize, neben anderen Sinnesindrücken wie Geschmack, Farbe etc. an der Auswahl und Erkennung einer Wirtspflanze durch Schmetterlingsraupen beteiligt sind (Hanson und Dethier [101], Schoonhoven und Dethier [86]). Dabei spielen die Duftstoffe vor allem in der ersten Phase dieses Entscheidungsprozesses, noch ehe die Raupen zu fressen beginnen, eine entscheidende Rolle (Schoonhoven [130]).

Die Wahrnehmung von Gerüchen kann bei Insekten über verschiedene Arten von Geruchsrezeptoren erfolgen: die sog. "Spezialisten" sprechen nur auf eine oder ganz wenige, strukturell sehr ähnliche Verbindungen an. Beispiele hierfür sind die Rezeptoren für die weiblichen Sexualpheromone auf den Antennen der entsprechenden adulten männlichen Insekten. Die Rezeptoren des anderen Typs, die sog. "Generalisten", reagieren auf ein breites Spektrum verschiedenartiger Stoffe (Schneider [131], Visser [88]).

So finden sich z.B. auf den Antennen von Schmetterlingsraupen viele solcher Geruchsrezeptoren vom Generalisten-Typ. Die einzelnen Rezeptorzellen verfügen über individuell verschiedene, aber sich gegenseitig überlappende Reaktionsspektren. Die Erkennung und Unterscheidung der Wirtspflanzen wird daher nicht durch die Reaktion spezialisierter Rezeptoren auf eine bestimmte Verbindung vermittelt ("one receptor - one compound" - Modell). Vielmehr löst das für die betreffende Pflanze typische, mehr oder weniger komplexe Stoffgemisch bei den Generalisten-Rezeptoren von Zelle zu Zelle verschiedene Reaktionen aus; das resultierende, komplizierte Reaktionsmuster wiederum charakterisiert diese Pflanze für die Raupe und dient als Code zu ihrer Erkennung ("pattern coding") (Dethier und Schoonhoven [132], Dethier [35]).

Es ist daher eine heute allgemein akzeptierte Hypothese, daß ein Insekt i.a. von einem Gemisch verschiedener flüchtiger Stoffe aus der Wirtspflanze angezogen wird, nicht von einer speziellen Substanz (Finch [83]). Allerdings kann dabei die attraktive Wirkung des jeweiligen komplexen Gesamtaromas meist durch eine Auswahl einer begrenzten Zahl von Verbindungen ("simplified aromatic pattern") simuliert werden (Schoonhoven [130], Pham-Delegue et.al. [133]).

Dies bestätigen auch experimentelle Befunde: Minyard et.al. [44] isolierten aus Baumwolle ein stark attraktives 5-Komponenten-Gemisch (α -Pinen, Limonen, β -Caryophyllen, Caryophyllenoxid, β -Bisabolol) für *Anthonomus grandis*; *Rhagoletis pomonella* wird von einer aus Äpfeln gewonnenen flüchtigen Fraktion mit 7 Verbindungen angezogen (Fein et.al. [47]). In beiden Fällen zeigten die Mischungen der entspre-

chenden synthetischen Stoffe eine hohe Attraktivität, die von keiner der jeweils beteiligten Einzelkomponenten alleine erreicht wurde.

Auch die quantitative Zusammensetzung, das richtige Mischungsverhältnis, spielt dabei eine entscheidende Rolle. Visser und Ave [46] konnten zeigen, daß die Attraktivität des Wirtspflanzengeruchs der Kartoffel für *Leptinotarsa decemlineata* geschwächt wird bzw. verloren geht, wenn man dem Kartoffelgeruch einzelne, in diesem Aroma enthaltene Komponenten zusetzt. Durch eine Veränderung des korrekten Mischungsverhältnisses der Komponenten wird der Pflanzengeruch "maskiert" und vom Insekt nicht mehr erkannt.

Nicht nur die Tatsache, daß die *H. armigera* - Larven von einem Kairomongemisch aus 4 Komponenten angezogen werden, sondern auch die Natur dieser 4 Stoffe steht in Einklang mit bisher in ähnlichen Untersuchungen gefundenen Resultaten : alle 3 beteiligten Monoterpene, Δ -3-Caren, Myrcen und α -Pinen wurden, allerdings nicht in dieser Kombination, bereits als für einige Insektenarten attraktiv beschrieben (vgl. Übersicht bei Visser [88]).

Die Wirksamkeit sowohl von Terpenen als auch von Alkoholen bei einer Insektenart ist z.B. für *Bombyx mori* - Larven bekannt : in Maulbeerblättern erkannten Hamamura und Naito [134] 4 Terpenoide und Hexenol als attraktive Stoffe. Die Anziehung von *Tomicus piniperda* beruht auf einem synergistischen Effekt von Monoterpenen und Ethanol (Vite et.al. [135]). Elektrophysiologische Untersuchungen untermauern diese Ergebnisse : so sprachen verschiedene Rezeptortypen bei *Periplaneta americana* besonders gut auf Alkohole und Terpene an (u.a. Pentanol-Typ, Alkohol-Terpen-Typ) (Sass [136]).

7. "Entstehung" der Kairomone

Listet man die Pflanzeninhaltsstoffe, die das Verhalten von Insekten beeinflussen, nach Substanzklassen auf, so ist festzustellen, daß die Terpene nicht nur bei den anziehenden, sondern auch bei den abstoßenden und fraßhemmenden Stoffen die größte Gruppe bilden (Smith [129]). Dies ist, wie das auf den ersten Blick unsinnig erscheinende Auftreten pflanzlicher, Insekten anlockender Kairomone überhaupt, nur unter dem Aspekt der "Ko-Evolution" von Pflanzen und Insekten zu verstehen.

Die Pflanzen entwickelten in ihrer Evolution Sekundärstoffe zur Abwehr pflanzenfressender Insekten. Bestimmte Insektenarten, die in der ständigen Wechselbeziehung mit den Pflanzen die Fähigkeit erlangten, diese Allomone zu tolerieren, gewannen dadurch den Vorteil einer zusätzlichen Nahrungsquelle. Schließlich konnten diese Insekten die ehemaligen pflanzlichen Abwehrstoffe sogar zu ihrem eigenen Vorteil nutzen, u.a. als Signalstoffe zur Erkennung der Wirtspflanze (Fraenkel [137]).

8. Mögliche Anwendungen des Kairomons

In Ovipositionsversuchen (Testanordnung modifiziert nach Saxena und Rembold [138]) konnte gezeigt werden, daß das 4-Komponenten-Kairomongemisch auch adulte *H. armigera*-♀♀ zur Eiablage anlockt (Schroth [139]). Die signifikante Attraktivität beruhte dabei auf der geruchlichen Wirkung des Kairomons, da die Versuchsanordnung keinen Kontakt der Testtiere mit der Duftquelle zuließ.

Dieser Befund erweitert die denkbaren Anwendungsmöglichkeiten des 4-Komponenten-Kairomons : z.B. könnten Fallen mit einer geeigneten Vorrichtung zur Langzeit-Emission des Kairomongemisches nicht nur als Larvenfallen, sondern auch als Fallen für adulte *H. armigera* konzipiert werden.

Die verschiedenen Einsatzmöglichkeiten pflanzlicher Kairomone zur Insektenbekämpfung faßten Finch [140] und Robert [141] zusammen. Dazu gehören Kairomonfallen, die analog zur Verwendung der Sexualpheromone beim "monitoring" bzw. "mass trapping" sowohl der Überwachung der Populationsdichte als auch der direkten Insektenkontrolle, in diesem Fall durch Abfangen der ♀♀ bzw. der Eier, dienen könnten. Denkbar ist auch, die ♀♀ zur Eiablage auf mit Kairomonen entsprechend präparierte "Fangpflanzen" ("trap crops") zu locken.

Für einige Insektenarten wurden insbesondere Kairomonfallen zu Überwachungszwecken bereits erfolgreich eingesetzt (Robert [141]). Feldversuche mit dem 4-Komponenten-Kairomon für *H. armigera* stehen dagegen noch aus.

Parallel zur vorliegenden Arbeit führten andere Versuche in unserer Arbeitsgruppe zur Anreicherung eines Ovipositionskairomons für *H. armigera* in der Mono-/Sesquiterpenfraktion des Hexanextraktes aus Blättern der Straucherbse (*Cajanus cajan*) (Rembold und Tober [142]). Möglicherweise können die hier beteiligten Stoffe nach ihrer vollständigen Identifizierung die Wirksamkeit des o.g. Kairomongemisches noch erhöhen.

In Zusammenarbeit mit dem ICRISAT wird darüber hinaus untersucht, inwieweit die Kairomone als Marker für eine Anfälligkeit der betreffenden Pflanze gegen *H. armigera* geeignet sind. Im Zuge der Züchtung resistenterer *C. arietinum*-Varietäten ist z.B. ein zuverlässiger Screening-Test zur Erkennung vielversprechender Kreuzungen erforderlich. Hier könnte die chemische Analyse der von einer Pflanze emittierten flüchtigen Stoffe die äußerst langwierigen und unsicheren Feldversuche ersetzen.

Die prinzipielle Eignung der ausgearbeiteten analytischen Methode für diese Zwecke konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden (s. IV.9); Versuche mit grünen Pflanzen im Feld sind momentan im Gange.

VI. Zusammenfassung

- (1) Es wurde ein biologischer Test entwickelt, der es erlaubt, die Reaktion von *H. armigera*-Raupen auf beliebige flüchtige Stoffe zu untersuchen. Der Testaufbau schließt den Einfluß anderer Faktoren (Feuchtigkeit, optische Reize) auf das Verhalten der Larven aus; er basiert auf dem Prinzip der Geruch-induzierten positiven Anemotaxis, da er den Raupen eine Wahlmöglichkeit zwischen einem duftstoffhaltigen und einem unbeladenen Luftstrom bietet. Der Test, der somit vor allem zum Nachweis attraktiv wirkender Verbindungen geeignet ist, erwies sich in den zahlreichen durchgeführten Versuchen als zuverlässig und gut reproduzierbar.
- (2) Als Geruchsquellen können in diesem Test sowohl Pflanzenmaterialien (z.B. Samenmehle) direkt eingesetzt werden, als auch synthetische oder natürliche Reinstoffe bzw. Stoffgemische in beliebigen Konzentrationen nach einer Adsorption an Tenax. Die Verwendung derartiger Tenax-Adsorptionsröhrchen im Test erlaubt eine kontrollierte und definierte Freisetzung der zu untersuchenden Verbindungen und gewährleistet die direkte Vergleichbarkeit der Testergebnisse mit den Resultaten der GC-Analytik (s.u.).
- (3) Es wurde eine Methode zur Probenahme und analytischen Untersuchung flüchtiger Pflanzeninhaltsstoffe erstellt, die das Aroma in repräsentativer Form erfaßt, nämlich so, wie es den tatsächlichen Geruchseindruck bestimmt. Das Verfahren (modifiziert nach Nitz et.al. [61]) beinhaltet folgende Schritte : Adsorption der flüchtigen Stoffe aus dem Headspace über dem Pflanzenmaterial an Tenax, thermische Desorption und Zwischenanreicherung der Substanzen in einem gekühlten Vorsäulchen im Injektorblock eines Gaschromatographen, quantitative (splitlose) Überführung der Stoffe auf die Kapillarsäule, dort gaschromatographische Auftrennung und anschließend Detektion der einzelnen Verbindungen durch einen FID bzw. in einem Massenspektrometer. Das gesamte Verfahren der Probenahme und GC-Analyse erwies sich nach eingehender Überprüfung als sehr leistungsfähig; es arbeitet ohne Lösungsmittel, vermeidet dadurch Verdünnungseffekte und erzielt eine hohe Empfindlichkeit.

Die Anwendung der erstellten Methoden auf *C. arietinum* - Samen ergab folgende Resultate :

- (4) Das Gesamtaroma gemahlener *C. arietinum* - Samen erwies sich als signifikant attraktiv für *H. armigera*-Raupen, unabhängig vom Larvenstadium und der bei der Larvenaufzucht verwendeten Nahrung.
- (5) Die GC/MS-Untersuchung der im Headspace über gemahlene *C. arietinum*-Samen enthaltenen flüchtigen Verbindungen lieferte Strukturvorschläge für insgesamt 154 Stoffe (s. Tab. 26, S. 78). Darunter befanden sich vor allem Monoterpenkohlenwasserstoffe, sonstige aliphatische Kohlenwasserstoffe und Alkohole. Für 125 Komponenten des Gesamtaromas konnten die auf den Massenspektren basierenden Strukturvorschläge mit Hilfe co-chromatographischer Analysen bzw. über die Kovats-Retentionsindices abgesichert werden. Unter den auf diese Weise einwandfrei identifizierten Substanzen befanden sich bis auf zwei Ausnahmen alle Stoffe mit einem Mengenanteil von mehr als 0.5% am Gesamtaroma.
- (6) Wie die quantitative Analyse mit Hilfe eines externen Standards zeigte, wurden bei einer Probenahme von 1.5 l des Headspace über gemahlene *C. arietinum* - Samen etwa 2.4 µg flüchtiger Stoffe erfaßt. Terpenoide und Alkohole mit Anteilen von 35% bzw. 18% am Gesamtaroma dominierten dabei; α -Pinen war mit 298 ng die in der größten Menge enthaltene Einzelkomponente. Die Nachweisgrenze des analytischen Verfahrens lag unter 1 ng.
- (7) 16 im *C. arietinum* - Gesamtaroma identifizierte Verbindungen wurden im biologischen Test untersucht. Eine signifikante Attraktivität für *H. armigera*-Larven konnte in den Tests mit Einzelsubstanzen nur für Pentan-1-ol nachgewiesen werden. Im Gemisch wirkten jedoch auch die drei Terpene Δ -3-Caren, Myrcen und α -Pinen stark anziehend.
- (8) Die weitaus höchste Attraktivität für *H. armigera*-Larven erreichte ein "Kairomongemisch" aus Pentan-1-ol, Δ -3-Caren, Myrcen und α -Pinen im gleichen Mischungsverhältnis wie im *C. arietinum*-Gesamtaroma (im Headspace etwa 2:5:1:9).

Die Bedeutung flüchtiger Kairomone in der Wechselwirkung zwischen Wirtspflanze und phytophagem Insekt und die potentiellen Anwendungsmöglichkeiten des gefundenen "Kairomongemisches" werden diskutiert.

VII. Literaturverzeichnis

- [1] Belitz H.-D., Grosch W.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie; Springer-Verlag, Berlin, (1982)
- [2] van der Maesen L.J.G.: *Cicer L.*, a monograph of the genus, with special reference to the chickpea (*Cicer arietinum L.*), its ecology and cultivation, 342 Seiten; Communications Agricultural University, Wageningen, 72-10, (1972)
- [3] Franke W.: Nutzpflanzenkunde; 2.Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, (1981)
- [4] Singh U.: Nutritional quality of chickpea (*Cicer arietinum L.*): current status and future research needs; Qual Plant Plant Foods Hum Nutr, 35, 339-351, (1985)
- [5] Chavan J.K., Kadam S.S., Salunkhe D.K.: Biochemistry and technology of chickpea (*Cicer arietinum L.*) seeds; CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 25, 107-158, (1986)
- [6] Singh U., Kumar J., Gowda C.L.L.: The protein content of chickpea (*Cicer arietinum L.*) grown at different locations; Qual Plant Plant Foods Hum Nutr, 32, 179-184, (1983)
- [7] Singh U., Jambunathan R.: Distribution of seed protein fractions and amino acids in different anatomical parts of chickpea (*Cicer arietinum L.*) and pigeonpea (*Cajanus cajan L.*); Qual Plant Plant Foods Hum Nutr, 31, 347-354, (1982)
- [8] Singh K.B., Reddy M.V., Nene Y.L.: International testing of chickpeas for resistance to *Ascochyta blight*; Plant Disease, 68, 782-784, (1984)
- [9] Weigand F., Köster J., Weltzien H.C., Barz W.: Accumulation of phytoalexins and isoflavone glucosides in a resistant and a susceptible cultivar of *Cicer arietinum* during infection with *Ascochyta rabiei*; J. Phytopathology, 115, 214-221, (1986)
- [10] Kessmann H., Barz W.: Elicitation and suppression of phytoalexin and isoflavone accumulation in cotyledons of *Cicer arietinum L.* as caused by wounding and by polymeric components from the fungus *Ascochyta rabiei*; J. Phytopathology, 117, 321-335, (1986)
- [11] Rembold H.: Malic acid in chickpea exudate - a marker for *Heliothis* resistance; International Chickpea Newsletter, No.4, 18-19, (1981)

- [12] Lateef S.S.: Progress in the search for chickpeas that are resistant to *Heliothis armigera* (Hub.); XVII International Congress of Entomology, Hamburg, FRG; August 20-26, (1984); Abstract volume, abstract R.12.4.3, S. 551
- [13] Koundal K.R., Sinha S.K.: Evaluation of the significance of malic acid secretion in chickpea; *Physiol. Plant.*, 58, 189-192, (1983)
- [14] Rembold H., Winter E.: The chemist's role in host-plant resistance studies; In: Proceedings of the International Workshop on *Heliothis* Management, 1981, Patancheru, India; S. 241-250, (1982)
- [15] Hill D.S.: Agricultural insect pests of the tropics and their control; Second Edition; Cambridge University Press, Cambridge, (1983)
- [16] Zalucki M.P., Daglish G., Firempong S., Twine P.: The biology and ecology of *Heliothis armigera* (Hübner) and *H. punctigera* Wallengren (*Lepidoptera: Noctuidae*) in Australia: what do we know? *Aust. J. Zool.*, 34, 779-814, (1986)
- [17] Lateef S.S.: Gram pod borer (*Heliothis armigera*) (Hub.) resistance in chickpeas; *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 14, 95-102, (1985)
- [18] Hardwick D.F.: The corn earworm complex; *Mem. ent. Soc. Can.*, 40, 1-247, (1965)
- [19] Jayaraj S.: Biological and ecological studies of *Heliothis*; In: Proceedings of the International Workshop on *Heliothis* Management, 1981, Patancheru, India; S. 17-28, (1982)
- [20] Manjunath T.M., Bhatnagar V.S., Pawar C.S., Sithanathan S.: Economic importance of *Heliothis* spp. in India and an assessment of their natural enemies and host plants; *Zur Veröffentlichung in: Proceedings of the Workshop on Biological Control of Heliothis*, November 11-15, (1985)
- [21] Reed W., Pawar C.S.: *Heliothis*: a global problem; In: Proceedings of the International Workshop on *Heliothis* Management, 1981, Patancheru, India; S. 9-14, (1982)
- [22] Gunning R.V., Easton C.S., Greenup L.R., Edge V.E.: Pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Hübner) (*Lepidoptera: Noctuidae*) in Australia; *J. Econ. Entomol.*, 77, 1283-1287, (1984)
- [23] Pawar C.S., Bhatnagar V.S., Jadhav D.R.: *Heliothis* species and their natural enemies, with their potential for biological control; *Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.)*, 95, 695-703, (1986)

- [24] Cameron P.J., Valentine E.W.: Evaluation of *Cotesia kazak* (Hymenoptera: Braconidae), a parasite of larval *Heliothis armigera conferta* (Lepidoptera: Noctuidae) in New Zealand; New Zealand J. of Agric. Res., 28, 545-553, (1985)
- [25] Mani M., Nagarkatti S., Narayanan K.: Influence of parasitism by *Eucelatoria bryani* (Dip.: Tachinidae) on the consumption and utilisation of chickpea flour diet by *Heliothis armigera* (Lep.: Noctuidae); Entomophaga, 27, 399-404, (1982)
- [26] Bong C.F.J.: Field control of *Heliothis zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) using a parasitic nematode; Insect Sci. Applic., 7, 23-25, (1986)
- [27] Hafez M., Salama H.S., Aboul Ela R.G., Ragaei M.: Evaluation of adjuvants for use with *Bacillus thuringiensis* against *Heliothis armigera* (Hübner); J. Appl. Ent., 103, 313-319, (1987)
- [28] Kristiansen B., Lewis C.: Bacterial insecticides: recent developments; TIBTECH, 4, 56-58, (1986)
- [29] Salama H.S., Moawed S.M., Megahed M.I.: Effect of nuclear polyhedrosis virus on the cotton bollworm, *Heliothis armigera* (Hübner); J. Appl. Ent., 102, 123-130, (1986)
- [30] Vogel S.: *Baculo-Viren: Biologische Insektizide - Werkzeuge der Molekularbiologie*; Chemie in unserer Zeit, 20, 77-83, (1986)
- [31] Nordlund D.A.: Semiochemicals: a review of the terminology, S. 13-28; In: Semiochemicals. Their role in pest control; Ed.: Nordlund D.A., Jones R.L., Lewis W.J.; John Wiley & Sons, New York, (1981)
- [32] Karlson P., Butenandt A.: Pheromones (ectohormones) in insects; Ann. Rev. Entomol., 4, 39-58, (1959)
- [33] Nesbitt B.F., Beevor P.S., Hall D.R., Lester R.: Female sex pheromone components of the cotton bollworm, *Heliothis armigera*; J. Ins. Physiol., 25, 535-541, (1979)
- [34] Campion D.G.: Survey of pheromone uses in pest control, S. 405-449; In: Techniques in Pheromone Research; Ed.: Hummel H.E., Miller T.A.; Springer-Verlag, New York, (1984)
- [35] Dethier V.G.: Mechanism of host-plant recognition; Ent. exp. & appl., 31, 49-56, (1982)
- [36] Reese J.C., Schmidt D.J., Mize T.W.: Physiological interactions between phytophagous insects and their hosts; ACS Symp. Series, 330, 463-476, (1987)

- [37] Miller J.R., Strickler K.L.: Finding and accepting host plants, S. 127-157; In: Chemical ecology of insects; Ed.: Bell W.J., Carde R.T.; Chapman and Hall, London, (1984)
- [38] Schoonhoven L.M.: Chemical mediators between plants and phytophagous insects, S. 31-50; In: Semiochemicals. Their role in pest control; Ed.: Nordlund D.A., Jones R.L., Lewis W.J.; John Wiley & Sons, New York, (1981)
- [39] Hongo H., Karel A.K.: Effect of plant extracts on insect pests of common beans; J. Appl. Ent., 102, 164-169, (1986)
- [40] Tingle F.C., Mitchell E.R.: Behavior of *Heliothis virescens* (F.) in presence of oviposition deterrents from elderberry; J. Chem. Ecol., 12, 1523-1531, (1986)
- [41] Saxena K.N.: Patterns of insect-plant relationships determining susceptibility or resistance of different plants to an insect; Ent. exp. & appl., 12, 751-766, (1969)
- [42] Saxena K.N.: Behavioural basis of plant resistance or susceptibility to insects; Insect Sci. Applic., 6, 303-313, (1985)
- [43] Rembold H.: Secondary plant products in insect control, with special reference to the azadirachtins, S. 481-491; In: Advances in Invertebrate Reproduction 3; Ed.: Engels W. et.al.; Elsevier Science Publishers B.V., (1984)
- [44] Minyard J.P., Hardee D.D., Guelndner R.C., Thompson A.C., Wiygul G., Hedin P.A.: Constituents of the cotton bud. Compounds attractive to the boll weevil; J. Agric. Food Chem., 17, 1093-1097, (1969)
- [45] Salama H.S., Rizk A.F., Sharaby A.: Chemical stimuli in flowers and leaves of cotton that affect behaviour in the cotton moth *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae); Entomol. Gener., 10, 27-34, (1984)
- [46] Visser J.H., Ave D.A.: General green leaf volatiles in the olfactory orientation of the Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*; Ent. exp. & appl., 24, 538-549, (1978)
- [47] Fein B.L., Reissig W.H., Roelofs W.L.: Identification of apple volatiles attractive to the apple maggot, *Rhagoletis pomonella*; J. Chem. Ecol., 8, 1473-1487, (1982)
- [48] Saxena K.N., Rembold H.: Attraction of *Heliothis armigera* (Hübner) larvae by chickpea seed powder constituents; Z. ang. Ent., 97, 145-153, (1984)

- [49] van Straten S., Maarse H.: Volatile compounds in food. Qualitative data. Division for nutrition and food research TNO; Zeist, the Netherlands; 5. edition, (1983)
- [50] Waldbauer G.P., Cohen R.W., Friedman S.: An improved procedure for laboratory rearing of the corn earworm, *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae); The Great Lakes Entomologist, 17, 113-118, (1984)
- [51] Roush R.T.: Inbreeding depression and laboratory adaptation in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae); Ann. Entomol. Soc. Am., 79, 583-587, (1986)
- [52] Leppla N.C., Carlyle S.L., Carlyle T.C.: Effects of surface sterilization and automatic collection on cabbage looper eggs; J. Econ. Entomol., 67, 33-36, (1974)
- [53] Raulston J.R., Lingren P.D.: Methods for large-scale rearing of the tobacco budworm; USDA, Agr. Res. Serv., Production Research Report No. 145, (1972)
- [54] Nagarkatti S., Prakash S.: Rearing *Heliothis armigera* (Hübner) on an artificial diet; Techn. Bull. No. 17, Commonwealth Institute of Biological Control, Bangalore, India; S. 169-173, (1974)
- [55] Dadd R.H.: Insect nutrition: current developments and metabolic implications; Ann. Rev. Entomol., 18, 381-420, (1973)
- [56] Singh P.: Artificial diets for insects, mites, and spiders; S. 327 ff.; IFI / Plenum Press, New York, (1977)
- [57] Singh P.: A general purpose laboratory diet mixture for rearing insects; Insect Sci. Applic., 4, 357-362, (1983)
- [58] Brewer F.D., Lindig O.: Ingredients for insect diets; S. 45-50; In: Advances and challenges in insect rearing; Ed.: King E.G., Leppla N.C.; USDA, Agr. Res. Serv., New Orleans, (1984)
- [59] Sokal R.R., Rohlf F.J.: Biometry; 2. edition; W.H. Freeman and Company, New York, (1981)
- [60] Precht M.: Bio-Statistik, Teil 1; 3. Auflage; Oldenbourg-Verlag, München, Wien, (1982)
- [61] Nitz S., Drawert F., Jülich E.: Trace analysis by intermediate trapping with a modified programmable temperature vaporizer; Chromatographia, 18, 313-317, (1984)
- [62] Wächter H., Drawert F., Nitz S.: Erprobung von Verfahren zur qualitativen und quantitativen Erfassung von Geruchsstoffen; VDI-Berichte, Nr. 561, 469-486, (1986)

- [63] Oreans M., Müller F., Leonhard D., Heim A.: The analysis of trace components using the total transfer technique in coupled column systems; S. 171-182; In: Analysis of volatiles. Proceedings International Workshop Würzburg, FRG, 1983; Ed.: Schreier P.; Walter de Gruyter, Berlin, (1984)
- [64] Hegazi E.M., Schopf R.: The influence of temperature on consumption and utilization of artificial diet by *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidopt., Noctuidae); Z. ang. Ent., 97, 321-326, (1984)
- [65] Visser J.H.: The design of a low-speed wind tunnel as an instrument for the study of olfactory orientation in the Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata*); Ent. exp. & appl., 20, 275-288, (1976)
- [66] Butler L.D., Burke M.F.: Chromatographic characterization of porous polymers for use as adsorbents in sampling columns; J. Chrom. Sci., 14, 117-122, (1976)
- [67] Schomburg G.: Gaschromatographie; 2. Auflage; VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, (1987)
- [68] Jennings W.: Gas chromatography with glass capillary columns; 2. edition; Academic Press, New York, (1980)
- [69] Poole C.F., Schuette S.A.: Contemporary practice of chromatography; Elsevier, Amsterdam, (1984)
- [70] van den Dool H., Kratz P.D.: A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography; J. Chromatog., 11, 463-471, (1963)
- [71] Schomburg G.: Gaschromatographische Retentionsdaten und Struktur chemischer Verbindungen. II. Methylverzweigungen und Doppelbindungen in offenkettigen Kohlenwasserstoffen; J. Chromatog., 23, 1-17, (1966)
- [72] Schomburg G., Dielmann G.: Identification by means of retention parameters; J. Chrom. Sci., 11, 151-159, (1973)
- [73] Hively R.A., Hinton R.E.: Variation of the retention index with temperature on squalane substrates; J. Gas Chrom., 6, 203-217, (1968)
- [74] Saeed T., Redant G., Sandra P.: Kovats indices of monoterpene hydrocarbons on glass capillary columns; HRC & CC, 2, 75-76, (1979)
- [75] Jennings W., Shibamoto T.: Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography; Academic Press, New York, (1980)

- [76] Zweig G., Sherma J.: Handbook of chromatography, volume I und II; CRC Press, Cleveland, Ohio, (1972)
- [77] Kovats E.: Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone; Helv. Chim. Acta, 41, 1915-1932, (1958)
- [78] Dietz W.A.: Response factors for gas chromatographic analyses; J. Gas Chrom., 5, 68-71, (1967)
- [79] ICRISAT; Annual Report 1985; Patancheru, India; (1986)
- [80] Jurs P.C., Lavine B.K., Stouch T.R.: Pattern recognition studies of complex chromatographic data sets; J. Res. NBS, 90, 543-549, (1985)
- [81] Whitehead A.T.: Electroantennogram responses by mountain pine beetles, *Dendroctonus ponderosae* Hopkins, exposed to selected semiochemicals; J. Chem. Ecol., 12, 1603-1621. (1986)
- [82] Payne T.L., Hart E.R., Edson L.J., McCarty F.A., Billings P.M., Coster J.E.: Olfactometer for assay of behavioral chemicals for the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Scolytidae); J. Chem. Ecol., 2, 411-419, (1976)
- [83] Finch S.: Assessing host-plant finding by insects; S. 23-63; In: Insect-plant interactions; Ed.: Miller J.R., Miller T.A.; Springer-Verlag, New York, (1986)
- [84] Khattar P., Saxena K.N.: Interaction of visual and olfactory stimuli determining orientation of *Papilio demoleus* larvae; J. Ins. Physiol., 24, 571-576, (1978)
- [85] Dethier V.G.: The function of the antennal receptors in lepidopterous larvae; Biol. Bull., 80, 403-414, (1941)
- [86] Schoonhoven L.M., Dethier V.G.: Sensory aspects of host-plant discrimination by lepidopterous larvae; Arch. Neerl. Zool., 16, 497-530, (1966)
- [87] Baker G.T., Parrott W.L., Jenkins J.N.: Sensory receptors on the larval maxillae and labia of *Heliothis zea* (Boddie) and *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae); Int. J. Morphol. & Embryol., 15, 227-232, (1986)
- [88] Visser J.H.: Host odor perception in phytophagous insects; Ann. Rev. Entomol., 31, 121-144, (1986)
- [89] Schneider D.: Insect antennae; Ann. Rev. Entomol., 9, 103-122, (1964)

- [90] Schwink I.: Experimentelle Untersuchungen über Geruchssinn und Strömungswahrnehmung in der Orientierung bei Nachtschmetterlingen; Zeitschr. f. vergl. Physiol., 37, 19-56, (1954)
- [91] Dicke M.: Volatile spider-mite pheromone and host-plant kairomone, involved in spaced-out gregariousness in the spider mite *Tetranychus urticae*; Physiol. Entomol., 11, 251-262, (1986)
- [92] Joyner K., Gould F.: Developmental consequences of cannibalism in *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae); Ann. Entomol. Soc. Am., 78, 24-28, (1985)
- [93] Doss S.A.: Effect of host plants on some biological aspects of the boll-worm *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae); Z. Pflanzenk. Pflanzensch., 86, 143-147, (1979)
- [94] Nachiappan R.M., Subramaniam T.R.: Studies on mass culturing of *Heliothis armigera* (Hbn.) (Noctuidae: Lepidoptera) on semi-synthetic diets. II. Effect on the development of pre-imaginal instars; Madras agric. J., 61, 8-13, (1974)
- [95] Griswold M.J., Trumble J.T.: Responses of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to light; Environ. Entomol., 14, 650-653, (1985)
- [96] Papaj D.R., Prokopy R.J.: Phytochemical basis of learning in *Rhagoletis pomonella* and other herbivorous insects; J. Chem. Ecol., 12, 1125-1143, (1986)
- [97] Jermy T., Hanson F.E., Dethier V.G.: Induction of specific food preference in lepidopterous larvae; Ent. exp. & appl., 11, 211-230, (1968)
- [98] de Boer G., Hanson F.E.: Foodplant selection and induction of feeding preference among host and non-host plants in larvae of the tobacco hornworm *Manduca sexta*; Ent. exp. & appl., 35, 177-193, (1984)
- [99] Schoonhoven L.M.: Sensitivity changes in some insect chemoreceptors and their effect on food selection behaviour; Proc. Kon. Ned. Akad. Wtsch. C, 72, 491-498, (1969)
- [100] Blaney W.M., Schoonhoven L.M., Simmonds M.S.J.: Sensitivity variations in insect chemoreceptors; a review; Experientia, 42, 13-19, (1986)
- [101] Hanson F.E., Dethier V.G.: Role of gustation and olfaction in food plant discrimination in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*; J. Ins. Physiol., 19, 1019-1034, (1973)

- [102] Saxena K.N., Schoonhoven L.M.: Induction of orientational and feeding preferences in *Manduca sexta* larvae for an artificial diet containing citral; Ent. exp. & appl., 23, 72-78, (1978)
- [103] Saxena K.N., Schoonhoven L.M. : Induction of orientational and feeding preferences in *Manduca sexta* larvae for different food sources; Ent. exp. & appl., 32, 173-180, (1982)
- [104] Weurman C.: Isolation and concentration of volatiles in food odor research; J. Agric. Food Chem., 17, 370-384, (1969)
- [105] Pope M.M., Gaston L.K., Baker T.C.: Composition, quantification, and periodicity of sex pheromone volatiles from individual *Heliothis zea* females; J. Ins. Physiol., 30, 943-945, (1984)
- [106] Brand J.M.: Pheromonal blends: certain components may only convey gross information; Biochemical Systematics and Ecology, 13, 341-343, (1985)
- [107] Tumlinson J.H., Mitchell E.R., Teal P.E.A., Heath R.R., Mengelkoch L.J.: Sex pheromone of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith); J. Chem. Ecol., 12, 1909-1926, (1986)
- [108] Hedin P.A.: Seasonal variations in the emission of volatiles by cotton plants growing in the field; Environ. Entomol., 5, 1234-1238, (1976)
- [109] Buttery R.G., Ling L.C., Wellso S.G.: Oat leaf volatiles: possible insect attractants; J. Agric. Food Chem., 30, 791-792, (1982)
- [110] Etievant P.X., Azar M., Pham-Delegue M.-H., Masson C.J.: Isolation and identification of volatile constituents of sunflowers (*Helianthus annuus* L.); J. Agric. Food Chem., 32, 503-509, (1984)
- [111] Buttery R.G., Ling L.C.: Corn leaf volatiles: identification using tenax trapping for possible insect attractants; J. Agric. Food Chem., 32, 1104-1106, (1984)
- [112] Buttery R.G., Xu C., Ling L.C.: Volatile components of wheat leaves (and stems): possible insect attractants; J. Agric. Food Chem., 33, 115-117, (1985)
- [113] Jennings W.G., Filsoof M.: Comparison of sample preparation techniques for gas chromatographic analysis; J. Agric. Food Chem., 25, 440-445, (1977)
- [114] Schaefer J.: Comparison of adsorbents in head space sampling; S. 301-313; In: Flavour '81, Proceedings of the 3rd Weurman Symposium; Ed.: Schreier P.; Walter de Gruyter & Co., Berlin, (1981)

- [115] Brown R.H., Purnell C.J.: Collection and analysis of trace organic vapour pollutants in ambient atmospheres. The performance of a tenax-GC adsorbent tube; J. Chromatog., 178, 79-90, (1979)
- [116] Sydor R., Pietrzyk D.J.: Comparison of porous copolymers and related adsorbents for the stripping of low molecular weight compounds from a flowing air stream; Analytical Chem., 50, 1842-1847, (1978)
- [117] Cole R.A.: The use of porous polymers for the collection of plant volatiles; J. Sci. Food Agric., 31, 1242-1249, (1980)
- [118] Johansen N.G.: Glass open tubular columns with thick liquid-phase films for low boiling compounds; Chromatography Newsletter, 7, 18-21, (1979)
- [119] Hatanaka A., Sekiya J., Kajiwara T.: Distribution of an enzyme system producing cis-3-hexenal and n-hexanal from linolenic and linoleic acids in some plants; Phytochem., 17, 869-872, (1978)
- [120] Sekiya J., Kajiwara T., Hatanaka A.: Volatile C₆-aldehyde formation via hydroperoxides from C₁₈-unsaturated fatty acids in etiolated alfalfa and cucumber seedlings; Agric. Biol. Chem., 43, 969-980, (1979)
- [121] Schreier P., Mosandl A.: Aromaforschung heute; Chemie in unserer Zeit, 19, 22-31, (1985)
- [122] Schormüller J.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie; 2.Auflage; Springer-Verlag, Berlin, (1974)
- [123] Sosulski F.W., Gadan H.M.: Lipid composition of chickpea cultivars; Journal of the American Oil Chemists Society, 62, 656-656, (1985)
- [124] Borthakur A., Bhat B.G., Ramadoss C.S.: The positional specificities of the oxygenation of linoleic acid catalyzed by two forms of lipoxygenase isolated from Bengal gram (*Cicer arietinum*); J. Biosci., 11, 257-263, (1987)
- [125] Ghirardi P., Marzo A., Ferrari G.: Lipid classes and total fatty acids pattern of *Cicer arietinum*; Phytochem., 13, 755-756, (1974)
- [126] Arya S.S.: Effect of water activity on storage changes in total carotenoids and lipids in Bengalgram (*Cicer arietinum*) dhal and flour; J. Food Sci. Techn., 18, 139-142, (1981)
- [127] Buttery R.G., Kamun J.A.: Volatile components of alfalfa: possible insect host plant attractants; J. Agric. Food Chem., 28, 978-981, (1980)

- [128] Tressl R., Drawert F., Heimann W.: Gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestandsaufnahme von Erdbeer-Aromastoffen; Z. Naturforschg., 24 b, 1201-1202, (1969)
- [129] Smith C.M.: Trends affecting research strategies in plant resistance to insects; Agriculture, Ecosystems and Environment, 18, 1-7, (1986)
- [130] Schoonhoven L.M.: Chemosensory bases of host plant selection; Ann. Rev. Entomol., 13, 115-136, (1968)
- [131] Schneider D.: Insect olfaction: Deciphering system for chemical messages; Science, 163, 1031-1037, (1969)
- [132] Dethier V.G., Schoonhoven L.M.: Olfactory coding by lepidopterous larvae; Ent. exp. & appl., 12, 535-543, (1969)
- [133] Pham-Delegue M.-H., Masson C., Etievant P., Azar M.: Selective olfactory choices of the honeybee among sunflower aromas: a study by combined olfactory conditioning and chemical analysis; J. Chem. Ecol., 12, 781-793, (1986)
- [134] Hamamura Y., Naito K.-I.: Food selection by silkworm larvae, *Bombyx mori*; Nature, 190, 879-880, (1961)
- [135] Vite J.P., Volz H.A., Paiva M.R., Bakke A.: Semiochemicals in host selection and colonization of pine trees by the pine shoot beetle *Tomicus piniperda*; Naturwissenschaften, 73, 39-40, (1986)
- [136] Sass H.: Zur nervösen Codierung von Geruchsreizen bei *Periplaneta americana*; J. Comp. Physiol., 107, 49-65, (1976)
- [137] Fraenkel G.S.: The raison d'être of secondary plant substances; Science, 129, 1466-1470, (1959)
- [138] Saxena K.N., Rembold H.: Orientation and ovipositional responses of *Heliothis armigera* to certain neem constituents; S. 199-210; In: Proc. 2nd Int. Neem Conf., Rauischholzhausen, (1983)
- [139] Schroth A.: Persönliche Mitteilung
- [140] Finch S.: Chemical attraction of plant-feeding insects to plants; Appl. Biol., 5, 67-143, (1980)
- [141] Robert P.-C.: Les relations plantes-insectes phytophages chez les femelles pondeuses: le rôle des stimulus chimiques et physiques. Une mise au point bibliographique; Agronomie, 6, 127-142, (1986)
- [142] Rembold H., Tober H.: Kairomones as pigeonpea resistance factors against *Heliothis armigera*; Insect Sci. Applic., 6, 249-252. (1985)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1984 bis Juni 1987 am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Rembold angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Rembold möchte ich aufrichtig für die ständige Betreuung und Bereitschaft zu motivierenden Diskussionen danken.

Mein Dank gilt ferner

Herrn Dr. W. Reed und Herrn Dr. S.S. Lateef (ICRISAT, Indien) für die großzügige Bereitstellung von *Heliothis armigera*-Puppen für die Laborzucht und von *Cicer arietinum*-Samenmaterial verschiedener indischer Zuchtsorten

Herrn Dr. S. Nitz und Herrn Dipl. Ing. H. Kollmannsberger (Institut für Lebensmitteltechnologie und Analytische Chemie der Technischen Universität München in Freising-Weißenstephan) für die Durchführung und Interpretation der massenspektrometrischen Messungen, für die Unterstützung beim Aufbau eines GC-Systems mit thermischer Desorption und für das Überlassen zahlreicher Referenzsubstanzen

Herrn Dr. A.K. Singh für die Durchführung einer Reihe von biologischen Tests und die gewissenhafte Betreuung der Laborzucht

Herrn J. Elstner für die Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen

Frau C. Oberstötter und meiner Frau Angelika für die kritische Durchsicht des Manuskripts

Lebenslauf

Name : Peter Wallner

Geburtsdatum : 12.12.1957

Geburtsort : München

Eltern : Irmgard und Otto Wallner

1964 - 1968 : Volksschule in München

1968 - 1977 : Klenze-Gymnasium in München

1977 : Abitur

1977 - 1978 : Zivildienst

1978 - 1982 : Studium der Lebensmittelchemie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

1982 : 1. Staatsprüfung

1983 : Praktische Ausbildung am Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern in München

1983 : 2. Staatsprüfung

seit 1984 : Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. H. Rembold am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried

